

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
Geschäftsführende Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Untersuchung zur Rolle von Leptin bei Arthrose:
Einfluss auf die Sekretion von MMPs und ihren Inhibitoren durch
arthrotische Synovialfibroblasten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Julia Borchert aus Paderborn

Marburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
14. September 2006.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Susanne Fuchs

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Lavinia Flores-de-Jacoby

Aus der Klinik für Orthopädie und Rheumatologie
Geschäftsführende Direktorin: Univ.- Prof. Dr. med. S. Fuchs
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Zusammenfassung

Untersuchung zur Rolle von Leptin bei Arthrose: Einfluss auf die Sekretion von MMPs und ihren Inhibitoren durch arthrotische Synovialfibroblasten

Julia Borchert

Ziel dieser Arbeit war es, den Stellenwert von Leptin in der Pathogenese der Osteoarthritis weiter aufzuklären. Durch die Korrelation von Leptinspiegel in der Synovialflüssigkeit mit klinischen Parametern, wie Arthrostadium, Geschlecht, Alter und BMI (Body Mass Index), sowie durch Untersuchungen zum Einfluss von Leptin auf die Regulation von relevanten matrixdegradierenden Proteasen (MMPs) und deren natürlichen Inhibitoren (TIMPs) in Synovialfibroblasten sollte geklärt werden, inwieweit Leptin am Voranschreiten der Arthrose beteiligt ist.

Methode: Mit Hilfe von Zytokin-Arrays wurde in Initialversuchen zunächst festgestellt, ob Arthrosepatienten erhöhte Leptinspiegel in der Synovialflüssigkeit aufweisen. Im Anschluss wurde mittels ELISA die Leptinkonzentration quantifiziert und mit unterschiedlichen klinischen Parametern korreliert. Die Expression von Leptin und Rezeptor in Synovialfibroblasten wurde durch PCR untersucht. Des Weiteren wurde im Rahmen von Stimulationsexperimenten mittels ELISA und Zymographie festgestellt, inwieweit Leptin (dosisabhängig) die Sekretion von MMPs und TIMPs sowie die Proteaseaktivität von MMPs in Synovialfibroblasten in vitro beeinflusst.

Ergebnisse: Es wurden erhöhte Leptinspiegel in Abhängigkeit von dem Schweregrad der Osteoarthritis festgestellt. Die Leptinspiegel zeigten eine signifikante Korrelation sowohl mit dem Arthrostadium als auch eine hochsignifikante Korrelation mit dem BMI und mit dem weiblichen Geschlecht. Neben Chondrozyten sind auch Synovialfibroblasten in der Lage, Leptin und auch den Leptinrezeptor zu exprimieren. Des Weiteren konnte eindeutig nachgewiesen

werden, dass Leptin keinen Einfluss auf die Sekretion, weder der untersuchten MMPs noch der TIMPs durch Synovialfibroblasten in vitro hat und somit zu keiner Veränderung der Netto-Proteaseaktivität führt.

Schlussfolgerung: Die stadienabhängige Erhöhung der Leptinspiegel in den Synovialflüssigkeiten der untersuchten Patienten weist auf eine Bedeutung von Leptin in der Pathogenese der Osteoarthritis hin. Allerdings lassen die Ergebnisse zur leptinabhängigen Regulation der MMP- bzw. TIMP-Sekretion durch die Synovialfibroblasten den Schluss zu, dass Leptin keinen oder zumindest keinen direkten Einfluss auf die Knorpeldegradation hat. So bleibt die Frage weiter offen, ob Leptin eine positive oder negative Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielt.

*Für meine geliebte Mutter, die noch kurz vor ihrem Tod
die ersten Seiten dieser Arbeit Korrektur las*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Kniegelenk.....	1
1.1.1	Struktur des hyalinen Knorpels.....	1
1.1.2	Zusammensetzung der Synovialis	3
1.2	Die Arthrose.....	5
1.2.1	Klinisches Bild.....	5
1.2.2	Epidemiologie und Ätiologie.....	8
1.2.3	Pathogenese	10
1.2.4	Leptin	19
1.2.5	Therapie	20
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	22
2	Material und Methode.....	24
2.1	Probenmaterial und Patienten	24
2.2	Klinische Parameter	24
2.2.1	Einteilung unter radiologischen Kriterien.....	25
2.2.2	Bestimmung des Body Mass Index (BMI)	25
2.3	Verfahrensbeschreibung zur Herstellung der Monolayerkultur	26
2.3.1	Isolation und Expansion der Synovialfibroblasten	26
2.3.2	Stimulation der Synovialfibroblastenkulturen	26
2.4	Methode der Analytik	27
2.4.1	Zytokin-Arrays.....	27
2.4.2	Expressionsanalysen (RT-PCR)	29
2.4.2.1	<i>Isolation von Gesamt-RNA</i>	29
2.4.2.2	<i>PCR</i>	30
2.4.3	ELISA	31
2.4.3.1	<i>MMP-/TIMP-ELISA</i>	31
2.4.3.2	<i>Leptin-ELISA</i>	35
2.4.4	Bestimmung der Proteaseaktivität (SDS-PAGE-Gelatine- Zymographie).....	37
2.5	Statistische Analyse	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Klinische Parameter	39
3.1.1	Alter und Geschlecht	39
3.1.2	Radiologischen Kriterien	39
3.1.3	Body Mass Index	40
3.2	Zytokin-Arrays.....	41
3.3	Leptinspiegel in Synovialflüssigkeiten	42
3.4	Korrelation der Leptinspiegel in Synovialflüssigkeiten mit den klinischen Parametern.....	43
3.5	Expression von Leptin und Rezeptor in Synovialfibroblasten	46
3.6	Effekt von Leptin auf die Proteaseaktivität von MMP	47
3.7	MMP-Sekretion	48
3.7.1	MMP-1	49

3.7.2	MMP-3	50
3.8	TIMP-Sekretion	50
3.8.1	TIMP-1	51
3.8.2	TIMP-2	52
4	Diskussion	53
5	Literaturverzeichnis	60
6	Abbildungsverzeichnis	69
7	Abkürzungsverzeichnis	71
8	Anhang	73
8.1	Lebenslauf	73
8.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer	74
8.3	Danksagung	75

1 Einleitung

1.1 Das Kniegelenk

Bei dem Kniegelenk handelt es sich um eine Diarthrose, d.h. ein echtes Gelenk, in dem die beiden Gelenkflächen durch einen Spalt voneinander getrennt sind. Es setzt sich zusammen aus den knöchernen Gelenkkörpern, dem Gelenkknorpel und der Gelenkkapsel, die sich aus Stratum fibrosum und Stratum synoviale zusammensetzt. Kollagene Bänder und Menisken dienen als Führungs- bzw. Sicherungsstrukturen [87].

Es artikulieren im Kniegelenk drei Knochen miteinander. Das Femur mit der Tibia in der Articulatio femorotibialis und das Femur mit der Patella in der Articulatio femoropatellaris. Beide Gelenke sind von einer gemeinsamen Gelenkkapsel eingeschlossen und liegen in einer zusammenhängenden Gelenkhöhle [5].

Das Kniegelenk ist das größte Gelenk des menschlichen Körpers. Aufgrund seines komplizierten Kapselapparates ist es sehr verletzungsanfällig [50].

1.1.1 Struktur des hyalinen Knorpels

Formen des ausdifferenzierten Knorpelgewebes sind hyaliner Knorpel, elastischer Knorpel und Faserknorpel. Der elastische Knorpel unterscheidet sich vom hyalinen Knorpel durch zusätzliche elastische Fasernetze. Der Faserknorpel enthält einen wesentlich höheren Anteil an Kollagenfasern als der hyaline Knorpel. Knorpelgewebe kommt sowohl im Skelett als auch in den Luftwegen vor.

Die am weitesten verbreitete Knorpelform, die im menschlichen Körper vorkommt, ist der hyaline Knorpel. Die knöchernen Flächen der Gelenke sind mit einer wenigen Millimeter dicken Schicht überzogen. Außerdem bildet der hyaline Knorpel den Ansatz der Rippen am Brustbein, kommt in Wachstumsfugen vor und bildet den Knorpel der Atemwege [54].

In der Regel ist der hyaline Knorpel gefäß- und nervenlos. Die Gefäße dringen lediglich bis ins Perichondrium vor, von wo aus die Knorpelzellen über Diffusion durch die Knorpelmatrix versorgt werden. Mit Ausnahme des Gelenkknorpels ist der hyaline Knorpel von Perichondrium umgeben. Die Knorpelzellen des Gelenkknorpels werden hauptsächlich von der Gelenkflüssigkeit aus versorgt [57].

Das Knorpelgewebe ist ein Stützgewebe, welches aus Knorpelzellen, den Chondrozyten und der von ihnen abgeschiedenen Interzellulärsubstanz (Knorpelmatrix) aufgebaut ist. Obwohl die Chondrozyten die extrazelluläre Matrix produzieren und damit die Eigenschaften des Gewebes kontrollieren, machen sie nur bis zu 5% der Gesamtmasse aus [12].

Die Chondrozyten liegen einzeln oder in Gruppen von 2-8 Zellen, die durch Teilung aus einer einzigen Zelle entstanden sind, in sogenannten Lacunen. Die Knorpelmatrix bildet rund um jede einzelne Zelle oder jede Zellgruppe ein Territorium, das unmittelbar als zu ihr gehörig erscheint. Chondrozyten plus dazugehöriges Territorium bilden eine funktionelle Einheit und werden als Chondrone bezeichnet. Diese regulieren Umsatz und Wasseraustausch der extrazellulären Matrix.

Diese extrazelluläre Matrix des hyalinen Knorpelgewebes besteht zu 20-30% aus Proteoglykanen, zu ca. 10% aus Mineralstoffen und zu 60-70% aus Wasser. An die Kernproteine der Proteoglykane sind fast ausschließlich Chondroitin- und Keratansulfate gebunden [95]. Diese sind zusammen mit Hyaluronsäure zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft, das sehr viel Wasser aufnehmen kann [4]. Der hohe Gehalt an Wasser wirkt als Stoßdämpfer oder biomechanische Feder, was vor allem beim Gelenkknorpel von Bedeutung ist.

Das wichtigste Proteoglykan des hyalinen Knorpels ist Aggrekan. Die Aggrekanmoleküle binden an Hyaluronsäure und sorgen somit für die komprimierte Starrheit des Knorpels.

Zwischen den Proteoglykanen liegen, an diese elektrostatisch gebunden, relativ dünne Kollagenfibrillen, die zu 90% vom Kollagentyp II sind [13, 67].

Die Struktur des Gelenkknorpels kann in drei Zonen eingeteilt werden: In der oberflächlichen Zone verlaufen dünne Kollagenfasern parallel zur Knorpeloberfläche. Aggrekan kommt nur sehr wenig vor. In dieser Zone ist die Dehnbarkeit bzw. die Nachgiebigkeit am stärksten. In der mittleren Zone ist die Zelldichte wesentlich geringer als in der oberflächlichen. Diese Zone vertritt die typische Morphologie des hyalinen Knorpels. Sie besitzt eine ausgedehnte extrazelluläre Matrix mit reichlich Aggrekan. Die kollagenen Fasern haben einen größeren Durchmesser und verlaufen ungeordneter. In der tiefsten Zone ist zwar die Zelldichte am geringsten, doch der Kollagenfaserdurchmesser und das Vorkommen von Aggrekan maximal [84].

Die aggrekanreiche Matrix bindet unter anderem durch die Interaktion zwischen Hyaluronsäure und ihrem Rezeptor (CD44) an der Oberfläche der Chondrozyten [49].

Die mechanischen Eigenschaften des hyalinen Knorpels sind dadurch gekennzeichnet, dass er besonders auf Druck beanspruchbar ist. Die Chondrozyten innerhalb der Knorpelkapsel wirken als druckelastische Polster. Die Kollagenfibrillen wirken den Spannungen entgegen, die durch Druckverformungen entstehen. Die Druckfestigkeit beträgt ca. $1,5 \text{ kp/mm}^2$ [95].

Die Funktionstüchtigkeit des Knorpels hängt zum einen von der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der Proteoglykane und ihrer Glykosaminoglykan-Ketten und zum anderen von dem geordneten Gefüge der Kollagenfibrillen ab. Beides kann mit zunehmenden Alter insuffizient werden, was sich vor allem im Falle des Gelenkknorpels bemerkbar macht [57].

1.1.2 Zusammensetzung der Synovialis

Die Gelenkkapsel ist eine Fortsetzung des Periosts. Sie besitzt ein äußeres straffes kollagenfaseriges Stratum fibrosum und ein inneres lockergebautes Stratum synoviale, die Gelenkinnenhaut [54].

Das Stratum synoviale setzt sich aus der synovialen Intima und einer regional unterschiedlich gebauten Subintima zusammen. Die Intima ist zellreich und bildet die Schicht der Synovialdeckzellen (Synovialozyten), die aus ca. 1-4 Lagen besteht. Die Subintima besteht aus lockerem bis straffem Bindegewebe. Sie enthält die Leitungsbahnen des Stratum synoviale. Außerdem stellt sie die Verbindung mit der fibrösen Kapsel her [4].

Der auffälligste Unterschied zwischen der aus lockerem Bindegewebe bestehenden Membrana synovialis und anderen körperhöhlenauskleidenden Geweben ist, dass die Basalmembran zwischen Intima und Subintima fehlt [57].

Die Schicht der Deckzellen der Intima ist lückenhaft bzw. fehlt sogar abschnittsweise. Es können drei Zelltypen unterschieden werden, die alle Hyaluronsäure produzieren. Die Typ-A-Zellen gehören zu den Makrophagen. Die Typ-B-Zellen sind durch reichlich Ergastoplasma ausgezeichnet und gleichen so den Fibroblasten. Der dritte Zelltyp ist eine intermediäre Form zwischen A und B [54].

Das quantitative Verhältnis von A-Zellen zu B-Zellen im menschlichen Knie beträgt ungefähr 2:1 [4].

Die Typ-A-Zelle wird von den Stammzellen des Knochenmarks gebildet [22]. Sie zählen zum monomolekulärem Phagozytensystem. Sie phagozytieren Bakterien und Zelltrümmer. Sie sind mit Klasse-II-Immunrezeptoren ausgestattet und zur Antigenpräsentation befähigt [4].

Die Typ-B-Zellen produzieren den Hauptanteil an Hyaluronsäure. Sie beweisen ihre hohe Verwandtschaft zu den Bindegewebszellen durch ihr fibroblastenähnliches Aussehen und ihre fibroblastenähnliche, funktionelle Eigenschaft, reichlich Interzellulärsubstanz zu sezernieren. Kennzeichnend ist die Expression von Uridindiphosphoglukosedehydrogenase (UPGD) [83]. Dieses Enzym ist für die Hyaluronsäuresynthese verantwortlich.

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen A- und B-Zellen ist die Markierung des B-Synoviozyten mit Hilfe monoklonaler Antikörper (Mab 67) [91].

Die durchschnittliche Lebensdauer dieser beiden Zelltypen wird mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Wochen angegeben [42].

Die molekulare Zusammensetzung der Synovia entspricht weitestgehend einem Dialysat des Blutes. Der Elektrolytgehalt und der Gehalt an organischen

Verbindungen gleicht weitgehend dem des Blutserums. Die Synovialis enthält, wie für Bindegewebe charakteristisch, reichlich extrazelluläre Matrix. Sie setzt sich aus Kollagenen (I, III, IV, V, VI), Proteoglykanen und Fibronektin zusammen [3].

Die Konsistenz der Synovia ist viskös und fadenziehend. Dies beruht auf dem hohen Gehalt an Hyaluronsäure, der 2-3 mg/ml beträgt. Außerdem findet man freie Zellen (bis zu 100 Zellen pro μl) in der Synovia. Diese sind hauptsächlich abgeschilferte Deckzellen und Leukozyten [4].

1.2 Die Arthrose

Bei der Arthrose (Synonyme: Osteoarthrose, Arthrosis deformans, degenerative Arthropathie) handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung. Es handelt sich primär um Abbau- aber auch um Umbauprozesse des Gelenkknorpels. Sekundär können Veränderungen der Kapsel, des Knochens und der Muskulatur folgen [87], die sich z.B. in Form von Verschmälerung des Gelenkspaltes, subchondrale Sklerosierung, Zystenbildung, Bildung von Osteophyten oder entzündlichen Veränderungen der Synovialmembran äußern können [26].

1.2.1 Klinisches Bild

Zunächst verläuft die Arthrose in den meisten Fällen symptomlos [45]. Durch jahrzehntelange Progredienz kommt es im Endstadium zur völligen Destruktion der osteochondralen Gelenkstrukturen, die häufig mit erheblicher Individualisierung verbunden sind. Dies bedeutet., dass das Anfangsstadium oft weit vor dem eigentlichen klinischen Erscheinungsbild liegt.

Zu den ersten subjektiven Hinweisen gehört oft das Gefühl der Steifigkeit. Patienten äußern das Gefühl, die Sehnen wären zu kurz. Außerdem werden

unbestimmte, diffuse Gelenkschmerzen und Schmerzen in der Muskulatur empfunden. Gelenkschmerzen treten vor allem früh nach dem Aufstehen und nach längerem Sitzen auf (Anlaufschmerz). Nach langem Stehen oder Arbeiten kann ein Ermüdungsschmerz auftreten. Unter Entlastung klingt der Arthroseschmerz rasch wieder ab. Langsam-progredient stellen sich, besonders an den unteren Extremitäten und an der Wirbelsäule, auffallende und störende Deformitäten ein, die, verbunden mit Schmerzen und Steifigkeit das klinische Bild bestimmen und die Lebensqualität hochgradig beeinträchtigen können [87].

Eine sekundäre Synovitis, die z.B. durch zu hohe Belastung entstehen kann, führt zu einer aktivierten Arthrose. Hier kann neben dem Schmerz noch eine Schwellung und eine Überwärmung des Gelenks, manchmal auch ein Gelenkerguß entstehen [93].

Das American College of Rheumatology legte 1986 und 1991 Kriterien zur Klassifikation der Osteoarthrose mit Lokalisationen an Knie, Händen und Hüftgelenk fest [1,2]. Die Beurteilungskriterien berücksichtigen das klinische Erscheinungsbild wie z.B. Schmerzintensität und Gelenksteifigkeit, sowie radiologische Veränderungen bezüglich Gelenkspaltweite und Osteophytenbildung. Außerdem werden laborchemische Parameter wie die Blutsenkungsgeschwindigkeit berücksichtigt.

ACR-Diagnosekriterien:

Klinische Befunde	Klinische und Röntgenbefunde	Klinische und Laborbefunde
<p>Knieschmerz und mindestens 3 der folgenden 6 Parameter (Sensitivität 95%, Spezifität 69%)</p> <p>alternativ: Knieschmerz und mindestens 4 der 6 Parameter (Sensitivität 84 %, Spezifität 89%)</p> <p>Alter > 50 Jahre</p> <p>Steifigkeit < 30 min</p> <p>Krepitation</p> <p>Druckschmerz am Knochen</p> <p>Vergrößerung der Knochenkonturen</p>	<p>Knieschmerz und mindestens 1 der folgenden 3 Parameter (Sensitivität 91%, Spezifität 86%)</p> <p>Alter > 50 Jahre</p> <p>Steifigkeit < 30 min</p> <p>Krepitation und Osteophyten</p>	<p>Knieschmerz und mindestens 5 der folgenden 9 Parameter (Sensitivität 92%, Spezifität 75%)</p> <p>Alter > 50 Jahre</p> <p>Steifigkeit < 30 min</p> <p>Krepitation</p> <p>Druckschmerz am Knochen</p> <p>Vergrößerung der Knochenkonturen</p> <p>Keine tastbare Überwärmung</p> <p>BSG < 40 mm/ 1. Stunde Rheumafaktor > 1:40</p> <p>Zeichen eines arthrotischen Gelenkergusses</p>

Abbildung 1.1: ACR-Klassifikationskriterien der Kniegelenksarthrose [1]

Kellgren und Lawrence klassifizierten 1957 die Osteoarthrose anhand von radiologischen Kriterien. Kriterien dabei waren Gelenkspaltverschmälerung, Osteophyten, Geröllzysten und subchondrale Sklerosierung [48]. Diese wurden

1961 von der WHO als allgemeingültige radiologische Kriterien der Arthrose anerkannt [66].

1.2.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die Arthrose ist weltweit die häufigste Gelenkerkrankung [18]. Vorwiegend sind das Kniegelenk, das Hüftgelenk, die Wirbelsäule und das Schultergelenk betroffen.

In Deutschland leben gemäß Schätzungen 8-10 Millionen Menschen mit einer Arthrose. 25% von ihnen leiden an Beschwerden, 5% befinden sich in dauerhafter ärztlicher Behandlung bzw. sind arbeitsunfähig. Die volkswirtschaftlichen Kosten sind enorm: Ein Ausfall von 37 Millionen Arbeitstage pro Jahr sind durch diese Erkrankung bedingt. Insgesamt rechnet man in Deutschland mit 4,5 Milliarden Euro Kosten, die pro Jahr entstehen [23].

Die Arthrose weist weltweit in allen ethnischen Gruppen eine hohe Prävalenz auf. Die Prävalenz liegt bei 20jährigen etwa bei 9%, bei 34jährigen bei 17% und steigt bei 65jährigen bis auf über 90% an [93].

Es werden zwei Formen der Arthrose unterschieden: Die primäre und die sekundäre Form. Die Ursachen der primären Arthrose sind weitestgehend unbekannt. Es besteht allerdings die Hypothese einer genetischen Prädisposition, die durch biomechanische, geschlechts- und altersabhängige sowie endokrinologische Faktoren zum Krankheitsbild der Arthrose führt. Die sekundären Arthrosen können sich auf dem Boden von metabolischen Störungen, Über- bzw. Fehlbelastungen, Traumen, Entzündungen oder auch altersabhängig entwickeln.

Primäre (idiopathische) Arthrosen	Sekundäre Arthrosen
<p>Biologische Minderwertigkeit des Gewebes unbekannter Ursache</p>	<p>Überlastung</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gelenkdysplasien - Achsenfehler - Instabilitäten - erworbene Formstörungen der Gelenke <p>Traumen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gelenkflächenfrakturen - Luxationen <p>Entzündliche Gelenkprozesse</p> <ul style="list-style-type: none"> - bakterielle Arthritiden - chronische Polyarthrititis <p>Metabolische Erkrankungen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Gicht - Chondrokalzinose - Ochronose <p>Endokrine Erkrankungen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hyperparathyreoidismus - Hypothyreose

Abbildung 1.2: Ätiologie der Arthrosen [73]

Die Einteilung in primäre und sekundäre Arthrosen wird von immer mehr Autoren in Frage gestellt. Sie halten die ätiologischen Faktoren in vielen Fällen

für zu vielfältig und zu komplex, um eine eindeutige Unterteilung rechtfertigen zu können [26].

Unabhängig von der Ätiologie kann man jedoch sagen, dass jede Form der Arthrose im Endstadium das gleiche klinische und pathologische Bild hervorruft. Letztendlich kommt es zu einer starken Beeinträchtigung bzw. zum Versagen des Gelenkes, sowohl im funktionellen als auch im strukturellen Sinne.

Risikofaktoren für Prädisposition zur Entstehung einer Arthrose	Risikofaktoren für abnorme biomechanische Belastung
<ul style="list-style-type: none"> • Alter • Weibliches Geschlecht, über 50jährig • Genmutationen in der $\alpha 1$-Kette des Kollagens Typ II mit herabgesetzter Reißfestigkeit • Vererbung anderer noch unbekannter Gene wie z.B. Fingerpolyarthrose 	<ul style="list-style-type: none"> • Adipositas • Berufsbedingte Überlastung • Übermäßig sportliche Belastung • Trauma mit Verletzung von Gelenkanteilen • Aggressive Gelenkentzündung

Abbildung 1.3: Risikofaktoren bei der Entstehung einer Arthrose [41]

1.2.3 Pathogenese

Die Knorpeldegenerationen, die im Rahmen einer Arthrose stattfinden, können in zwei Phasen eingeteilt werden. In der initialen, hypermetabolischen Phase kommt es zur kompensatorischen Bildung von Matrixbestandteilen, hauptsächlich Proteoglykane und Kollagen Typ II, die verloren gegangen sind und zu einer Knorpelerweichung geführt haben. In der zweiten Phase folgt die Dekompensation der Reparationsmechanismen, die durch schnellen Nettoverlust der Knorpelbestandteile gekennzeichnet ist. Neben dem Knorpel reagiert jedoch

auch der subchondrale Knochen, der durch die vermehrte Belastung sklerosiert und die synoviale Schleimhaut, die sich entzündet [41].

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Autoren mit den Vorgängen der Pathogenese beschäftigt. Eine vollständige Erklärung konnte jedoch bisher nicht gefunden werden. Was aber feststeht, ist, dass Zytokine eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Gelenkerkrankungen spielen. Zytokine, die auch als regulatorische Peptidfaktoren bezeichnet werden, werden von den verschiedensten Zellen gebildet, sezerniert und regulieren meist als parakrine Faktoren Proliferation bzw. Differenzierung und Funktion ihrer Zielzelle [55]. Diese interzellulären Botschafter übernehmen einen wichtigen Teil in der normalen Physiologie. Die Integrität des Gelenkknorpels wird durch die Balance zwischen den von Zytokinen gesteuerten anabolischen und katabolischen Prozessen bestimmt. Unregulierte oder erhöhte Sekretion von diesen Molekülen spielt eine große Rolle in der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen [97].

Man unterscheidet Zytokine mit anabolischer und katabolischer Aktivität und jene, die die anabolischen bzw. katabolischen Prozesse regeln.

Anabolische Aktivität	Katabolische Aktivität	Regler von anabolischer und katabolischer Aktivität	
IGF	IL-1 β	IL-4	GM-CSF
TGF- β	TNF- α	IL-6	IFN γ
	LIF	IL-8	MCP
		IRAP	PDGF
		BFGF	

Abbildung 1.4: Verschiedene Aktivitäten verschiedener Zytokine [97]

Im Folgenden werden Faktoren aufgezählt, die nach heutigem Kenntnisstand mit Knorpeldegenerationen im Zusammenhang stehen und somit an der Entstehung von Arthrose beteiligt sind.

Interleukin-1 (IL-1), welches hauptsächlich von Chondrozyten und aktivierten Makrophagen gebildet wird [6], gilt sowohl in der α - als auch in der β -Form als inflammatorisches Zytokin. IL-1 kann der Gruppe der destruktiven Zytokine zugeordnet werden. Einerseits hemmt es die Chondrozyten bei der Proteoglykansynthese, andererseits stimuliert es die Chondrozyten zerstörende Proteasen, sogenannte Matrixmetalloproteinasen (MMPs), abzugeben [6].

IL-1 unterdrückt die Synthese von dem für Gelenkknorpel charakteristischen Kollagen Typ II, gleichzeitig stimuliert es die Synthese von Kollagen Typ I, welches ein für Fibroblasten typisches Kollagen ist [97].

IL-1 inhibiert die Proliferation von Chondrozyten, induziert in den Knorpelzellen die Produktion von Stickoxid und trägt zu einer erhöhten Apoptose der Chondrozyten bei [9, 86]. Es stimuliert die Expression von Kollagenasen, Stromelysin und dem Gewebs-Plasminogen-Aktivator [33].

In einer Studie stellten Fong et al. 1994 fest, dass bei Patienten mit erosiver rheumatoider Arthritis ein höherer IL-1-Spiegel in der Synovialflüssigkeit vorhanden ist als bei Patienten ohne Erosionen und beweisen damit die zentrale Rolle von diesem Botenstoff in der Pathogenese der Arthrose [29].

In einer weiteren Studie über IL-1-produzierende Zellen war der Anteil von IL-1 α und IL-1 β sezernierenden Makrophagen signifikant höher als in der nicht-arthrotischen Synovialflüssigkeit [97].

Außerdem wurde in einer Studie gezeigt, dass die Gabe von Antikörpern gegen IL-1 β bei Mäusen, bei denen experimentell eine Arthrose induziert wurde, die Knorpelzerstörung stark reduziert werden konnte [46].

Damit es zu einer Gelenkzerstörung kommt, müssen die katabolischen Zytokine an spezielle Rezeptoren der Zielzellen binden. Die erhöhte Expression von IL-1-Rezeptoren in arthrotischen Chondrozyten bewirkt, dass die gleiche IL-1-Konzentration eine 3-4 mal geringere Stimulation der Matrixmetalloproteinasen erfordert, als in normalen Chondrozyten. Bereits eine Besetzung von 1% der Rezeptoren mit IL-1 stimuliert die Produktion von katabolischen Enzymen in den Chondrozyten. Eine 4%ige Besetzung wäre im gesunden Gewebe normal [97].

Der Tumornekrose-Faktor (TNF) gehört ebenfalls zu den destruktiven Zytokinen, jedoch mit einem 10mal geringeren Potential als IL-1. Der Beweis für die Produktion und die Präsenz in der Synovia von Patienten mit Arthrose ist jedoch noch sehr umstritten. TNF wurde nicht immer und häufig nur in kleinen Mengen im arthrotischen Gelenk nachgewiesen [97].

TNF besitzt ähnliche Eigenschaften wie IL-1, z.B. stimuliert er auch die Synthese von Matrixmetalloproteinasen. Außerdem wird dieser Faktor, genau wie IL-1, von Chondrozyten und aktivierten Makrophagen gebildet. IL-1 kann in experimentellen Arthritismodellen durch Anti-IL-1-Antikörper oder IL-1-Rezeptorantagonisten neutralisiert werden und dadurch die Knorpelzerstörung reduzieren. Im Gegensatz dazu wirkt eine Behandlung mit Anti-TNF hauptsächlich anti-inflammatorisch [6].

Matrix-Metalloproteinasen werden hauptsächlich von Bindegewebszellen synthetisiert und sezerniert und sind an der Degradierung der extrazellulären Matrix beteiligt.

Zu der ständig wachsenden Familie der membranständigen Matrix-Metalloproteinasen gehören zur Zeit 25 Familienmitglieder (siehe Abbildung 1.5).

<u>MMP</u>	<u>Synonym</u>
MMP-1	Kollagenase-1, interstitielle Kollagenase, Fibroblastenkollagenase
MMP-2	Gelatinase A, 72 KD Gelatinase, Typ IV-Kollagenase (72 KD)
MMP-3	Stromelysin-1, Transin-1
MMP-7	Matrilysin (PUMP-1)
MMP-8	Kollagenase-2, neutrophile Kollagenase
MMP-9	Gelatinase B, 92 KD Gelatinase, Typ IV-Kollagenase (92 KD)
MMP-10	Stromelysin-2, Transin-2
MMP-11	Stromelysin-3
MMP-12	Makrophagen Metalloelastase
MMP-13	Kollagenase-3, Rattenkollagenase
MMP-14	MT-1MMP, Membran-Typ-MMP-1
MMP-15	MT-2MMP, Membran-Typ-MMP-2
MMP-16	MT-3MMP, Membran-Typ-MMP-3

MMP-17	MT-4MMP, Membran-Typ-MMP-4
MMP-18	Kollagenase-4, Xenophus-Kollagenase
MMP-19	
MMP-20	Enamelysin
MMP-21	
MMP-22	
MMP-23	CA-MMP
MMP-24	MT-5MMP, Membran-Typ-MMP-5
MMP-25	MT-6MMP, Membran-Typ-MMP-6, Leukolysin
MMP-26	Endometase, Matrilysin-2
MMP-27	
MMP-28	Epilysin

Abbildung 1.5: Tabellarische Zusammenstellung der derzeit bekannten Matrix-Metalloproteinasen [8, 16, 70, 71, 76, 100]

Derzeit können MMPs in folgende Untergruppen eingeordnet werden: 3 Kollagenasen, 2 Gelatinasen, 3 Stromelysine und 6 membranständige Peptidasen. Matrilysin (MMP-7), die Makrophagen Elastase (MMP-12), das MMP-19, das Enamelysin (MMP-20), das MMP-26 und das Epilysin (MMP-28) können allerdings diesen Subgruppen nicht zugeordnet werden.

Der größte Teil von ihnen hat sein Optimum der enzymatischen Aktivität im physiologischen pH-Bereich.

MMPs, welche zinkabhängige Endopeptidasen sind, sind an unzähligen, vielfältigen physiologischen und pathologischen Prozessen des tierischen und menschlichen Organismus beteiligt, welche die stukturgebenden makromolekularen Komponenten, wie z.B. Kollagene und Proteoglykane des Binde- und Stützgewebes betreffen [75, 100]. Sämtliche Prozesse der Embryogenese, der Morphogenese, der Angiogenese, der Immunogenese, der Gewebsreparation und der Gewebsdegradation gehören dazu. Proliferation, Differention, Migration und letztendlich der Tod der Zelle werden von diesen

matrixtransformierenden Peptidasen geregelt. Für pathologische Prozesse ist eine erhöhte Menge an MMPs, die das kontrollierte Maß übersteigt, verantwortlich.

Zu den bekanntesten Proteinasen im Zusammenhang mit der Pathogenese der Arthrose gehören neben der Gelatinase-A (MMP-2), der Kollagenase-2 (MMP-8) und der Gelatinase-B (MMP-9) die interstitielle Kollagenase-1 (MMP-1) [7, 16, 27, 94], das Stromelysin-1 (MMP-3) [16, 39, 65, 77, 100] und die Kollagenase-3 (MMP-13) [7, 27, 94]. Eine Übersicht über die Herkunft und Substratspezifität dieser drei Proteinase gibt die Abbildung 1.6.

MMP	Synonym	Substrat	Expression
MMP-1	Kollagenase-1	Kollagen-Typ I, II, III V, VII, VIII, X, Aggrekan, Gelatine	Fibroblasten Chondrozyten Osteoblasten Keratinozyten Endothelzellen Epithelzellen Makrophagen Hepatozyten
MMP-3	Stromelysin-1	Kollagen-Typ II, IV, V, IX, X, XI, Aggrekan, Gelatine, Elastin, Proteoglykan, Fibronectin, pro-MMP-1, -8, -9, Laminin, Prokollagenase	Fibroblasten Chondrozyten Keratinozyten Makrophagen Endothelzellen Epithelzellen Gefäßmuskelzellen
MMP-13	Kollagenase-3	Kollagen-Typ I, II, III, IV, V, IX, X, XI, Aggrekan, Gelatine, Laminin, Fibronectin	Fibroblasten Chondrozyten Osteoblasten

Abbildung 1.6: Tabellarische Übersicht der Substratspezifität und Herkunft von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 [8, 16, 70, 71, 76 ; 100].

Proteolytische, aktivierte Kollagenasen sind in der Lage intakte Tripelhelixstrukturen des Kollagens in thermolabile Fragmente zu spalten. Im Vergleich zu den Gelatinasen und Stromelysinen besitzen die Kollagenasen die geringste Anzahl an Substrataffinitäten.

Die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 sind in der Lage, die einzelnen vordegradierten denaturierten Kollagen-polypeptidketten in weitere kleinere Fragmente zu teilen.

Die Stromelysine MMP-3, MMP-10 und MMP-11 sind Proteinasen mit einem breiten Substratspektrum. Sie zerlegen sowohl Kollagen als auch Proteoglykane in große aber lösliche Fragmente.

Damit es nicht zur Eskalation pathologischer Mechanismen kommt, ist es wichtig, dass ein fließendes Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau gegeben ist. Um diese Homöostase zu erreichen, gibt es Faktoren, die die MMPs inhibieren und damit regulieren. Diese Rolle übernehmen die „Tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP). Bisher konnten vier TIMP-Formen beschrieben werden. Es handelt sich um 180 Aminosäuren lange 20 KD große Glykoproteine, die insgesamt eine große Strukturhomologie aufweisen. Durch die hohe Affinität zu den MMPs bilden sie mit diesen 1:1 Komplexe [20]. Im arthrotischen Knorpel und in der arthrotischen Synovialflüssigkeit befindet sich nicht die gleiche Menge von TIMP wie von MMPs. Dieses Ungleichgewicht lässt einen Zusammenhang zwischen dem Fortschreiten der Arthrose und dem erhöhten MMP-Spiegel vermuten. Es besteht also ein relativer Mangel an Inhibitoren [19].

Interleukin-6 (IL-6) wird ebenfalls häufig als Faktor genannt, der zu den pathologischen Prozessen der Arthrose beiträgt, indem er die Zahl der Entzündungszellen im Synovialgewebe erhöht, die Proliferation der Chondrozyten hemmt und die Effekte von IL-1 auf die erhöhte MMP-Synthese und Hemmung der Proteoglykanproduktion verstärkt. IL-6 stimuliert die Produktion von TIMP, aber nicht von MMP selbst. Dadurch wird vermutet, dass dieses Zytokin in einem Feedbackmechanismus involviert ist, welches der Knorpelzerstörung durch die Enzyme entgegenwirkt [62].

Auch die Tatsache, dass eine positive Korrelation zwischen der in der Synovialflüssigkeit gemessenen IL-6-Konzentration und der wachsenden Proteoglykansynthese bei den Chondrozyten festgestellt wurde, lässt darauf

schließen, dass IL-6 sowohl anabolische als auch katabolische Aktivitäten stimuliert [97].

Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13) kann man der Gruppe der regulatorischen Zytokine zuordnen. Sie können Makrophagen und Chondrozyten bei der Produktion von IL-1 und TNF hemmen. Außerdem können sie die Synthese der Inhibitoren dieser Zytokine, z.B. den IL-1 Rezeptorantagonisten, stimulieren. IL-4 hat einen direkten positiven Effekt auf die Chondrozyten, indem es für die Reduzierung der induzierenden NO-Synthase (iNOS) sorgt.

Es konnte ein besserer Therapieerfolg registriert werden, wenn IL-4 und IL-10 in Kombination angewendet werden, da diese einen Effekt auf die TNF/IL-1-Produktion auf verschiedene Stadien, wie Transkription und Translation, ausüben [6].

Insulinlike growth factor (IGF) gehört zu den Wachstumsfaktoren und existiert in zwei verschiedenen Formen: IGF-I und IGF-II. IGF-I ist ein Synonym zu Somatomedin C, IGF-II verhält sich dem skelletalen Wachstumsfaktor gegenüber sehr ähnlich. IGF-I reduziert die Degradierung des Proteoglykans und unterstützt dessen Synthese, besonders bei Anwesenheit von IL-1 β und TNF α [97].

IGF hat keinen direkten Einfluss auf die IL-1-Produktion bzw. -Aktivität, kann aber deren katabolischen Eigenschaften entgegenwirken.

Dieses Zytokin ist unter physiologischen Bedingungen der wichtigste anabolische Wachstumsfaktor im erwachsenen Gelenkknorpel. Eine Reduzierung würde eine Verringerung der Proteoglykansynthese in den Chondrozyten bedeuten und letztendlich zu einem Zusammenbruch der Proteoglykane führen.

Es gibt noch eine Reihe anderer Wachstumsfaktoren, die die Syntheseleistung und die Aktivität der Chondrozyten steigern. Hierzu gehören der transforming growth factor beta (TGF- β), der fibroblast growth factor (FGF) und der platelet derived growth factor (PDGF). TGF- β stimuliert normale Chondrozyten in einem nur geringen Maße. Bei längerer Exposition kann sich jedoch der Phänotyp ändern, und die Chondrozyten können gegenüber TGF- β sensibler werden. Das Resultat ist eine Steigerung der Proteoglykansynthese, die den katabolischen Prozessen, z.B. von IL-1 entgegenwirkt. Dadurch kommt es also zu einer Entkopplung der entzündlichen Prozesse und der Knorpelzerstörung.

TGF- β wirkt chemotaktisch, lockt Leukozyten in das Synovialgewebe, erzeugt die Proliferation der Fibroblasten und reduziert aber gleichzeitig den Proteoglykanabbau im Knorpel [6].

bFGF (basic fibroblast growth factor) wird von Makrophagen und Chondrozyten gebildet. Es veranlasst die Chondrozyten dazu, Proteasen freizugeben, die die IL-1 Produktion erheblich steigern. Außerdem kann es die Expression von TNF-Rezeptoren erhöhen [97].

Ein weiterer dem Anabolismus zuzuordnender Faktor ist BMP-2 (bone morphogenic protein). IL-1 β und TNF- α stimulieren die Produktion von aktivem BMP-2. BMP-2 wiederum verstärkt die Synthese von extrazellulärem Molekülen der Chondrozyten, Aggrekan und TypII-Kollagen [32] und wirkt somit, wenn auch nur gering, IL-1 entgegen [6].

BMP-2 war in normalen erwachsenen Knorpel fast gar nicht zu beobachten, jedoch in arthrotischen Zellen besonders. Diese Erkenntnisse deuten eine mögliche Synthese von BMP-2 durch arthrotische Zellen an und somit einen Zusammenhang von BMP-2 und dem Zustand der Arthrose. Außerdem ist anzunehmen, dass es eine zonenspezifische Verteilung von BMP-2 gibt, die abhängig vom Grad der Zerstörung ist, die die Arthrose verursacht hat. Eine signifikante BMP-2 Expression wurde im osteophytischen Gewebe beobachtet [72].

CTGF (connective tissue growth factor), ein weiterer Wachstumsfaktor, gehört zur genetischen Familie, die als CCN-Familie bekannt ist. Obwohl die exakten Funktionen des CTGF nicht bekannt sind, sind diese Proteine in viele biologische Prozesse, wie die Embryonalentwicklung, Gewebereparatur und Tumorerdrückung involviert. Es wurde eine erhöhte Expression von CTGF in hyperthrophen Chondrozyten des wachsenden Knorpels beobachtet. In Addition dazu wurde berichtet, dass rekombinantes CTGF die Proliferation und Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten fördert. Diese Effekte an wachsenden Knorpelzellen deuten an, dass CTGF in der Funktion und der Erhaltung von Gelenkknorpel eine Rolle spielen könnte [74].

Insgesamt erscheint es offensichtlich, dass die Pathologie des Knorpels mit einer Überproduktion von destruktiven Zytokinen zusammenhängt. Aber es tragen auch eine insuffiziente anabolische Stimulation und eine inadäquate Kontrolle der regulatorischen Zytokine zur Pathologie bei [6]. Wichtig ist also, dass ein

Gleichgewicht zwischen den Mediatoren, die das große Netzwerk der Knorpelzerstörung bestimmen, vorliegt.

1.2.4 Leptin

Leptin ist ein kleines 16-kDa Protein, welches durch das Fettleibigkeitsgen (ob/ob) verschlüsselt ist [101]. Es wurde erst im Jahre 1994 entdeckt. Es wird von dem griechischen Wort „leptos“ abgeleitet, was soviel heißt wie „dünn“. Es wird vorwiegend von Zellen des weißen Fettgewebes produziert. Leptin reguliert sowohl die Nahrungsaufnahme als auch den Energieverbrauch über den Hypothalamus. In der Entdeckung des Leptins spielte ein Versuch mit genetisch übergewichtigen Mäusen (ob/ob) eine Rolle. Bei diesen Mäusen lag eine Mutation vor, die zu einem falschen Stop-Codon führte. Sie konnten kein funktionelles Protein produzieren und wiesen eine erhebliche Fettleibigkeit auf. Das Hormon erreicht seine biologischen Effekte, indem es mit spezifischen Rezeptoren (OB-R) interagiert, die aus alternativen Splicing aus einem db-gen Transkript hervorgehen.

Da Leptin und der Leptinrezeptor ähnliche Strukturen und auch funktionelle Eigenschaften aufweisen wie die Familie des Zytokins IL-6 und sich vom Fettgewebe herleitet, wird es auch als Adipozytokin klassifiziert.

Aufgrund der großen Anzahl an Ob-Rezeptoren im peripheren Gewebe, ist anzunehmen, dass es sich bei Leptin um ein polyphänes Hormon handelt, das in zahlreichen physiologischen Prozessen wie z.B. der Lipidhomöostase, Insulinsekretion, reproduzierende Funktionen, Thermogenese oder Angiogenese, involviert ist [21]. Außerdem spielt Leptin durch die Rezeptoren in peripheren Blutzellen, in Endothelzellen der Gefäße, glatten Muskelzellen oder Osteoblasten eine Rolle als Regler der Entzündungs- und der Immunantwort. Es wirkt wie ein Wachstumsfaktor [11]. Es kommt zu einer erhöhten Leptinsynthese als Antwort auf eine akute Infektion, Sepsis oder vermehrte Sekretion von Entzündungsmediatoren wie IL-1, TNF- α und LIF (leukemia inhibiting factor) [24, 38, 89].

In einer früheren Studie zeigten Figenschau et al. die Entdeckung des funktionellen Leptinrezeptors im menschlichen, erwachsenen Chondrozyten des Gelenkknorpels. Die Behandlung von isolierten Zellen in vitro zeigte sowohl die Stimulation der Proliferation der Zellen als auch die Stimulation der Proteoglykansynthese. Diese Erkenntnisse deuteten eine neue Rolle für das skelettale Wachstum und Entwicklung und die damit verbundene zukünftige Behandlung an [28].

Aber nun stellt sich die Frage, welche Rolle Leptin im Zusammenhang mit Arthrose spielt. Dass es einen möglichen Zusammenhang gibt, ergibt sich aus der Beziehung zwischen einem hohen body mass index (BMI) und einem wachsenden Risiko für Arthrose [61].

Chondrozyten zeigen im Gegensatz zum normalen Gelenkknorpel, in dem die metabolische Aktivität gering ist, im arthrotischen Gewebe eine höhere Aktivität. In den verschiedenen Stadien des Krankheitsprozesses steigt sowohl die anabolische als auch die katabolische Aktivität an. Zusammen mit der wachsenden Produktion und Aktivität der Zytokine, die den Katabolismus stimulieren, werden auch viele Wachstumsfaktoren, eingeschlossen IGF-1, TGF- β und BMP-2 hochreguliert, als Versuch der Chondrozyten einen Reparaturmechanismus zu aktivieren, was eine Antwort auf die Matrixzerstörung darstellen soll [56].

Dumond et al. (2003) zeigten, dass Leptin die Expression von IGF-1 und TGF- β in Chondrozyten stimuliert, was wiederum mit einer wachsenden Proteoglykansynthese verbunden ist, und somit auf eine entscheidene Rolle des Leptins in der Pathogenese der Osteoarthrose hindeutet [21].

1.2.5 Therapie

Aktuell gibt es eine große Vielfalt an Möglichkeiten, die Arthrose zu therapieren. Grundsätzlich kann man zwischen konservativer und chirurgisch-orthopädischer Therapie unterscheiden. Es gibt keine „spezifische“ konservative Therapie, die den Krankheitsprozess der Arthrose beim Menschen ändert bzw. sogar bestehende Schäden repariert. Vielmehr handelt es sich bei der konservativen Therapie um

eine symptomatische Behandlung mit physiotherapeutisch orientierten Therapieformen oder auch mit analgetischen und entzündungshemmenden Medikamenten [41], die die Beschwerden lindern und die Progredienz möglichst stoppen sollen. Um die Entzündung und die Funktionseinschränkung zu reduzieren, werden Medikamente wie nichtsteroidale Antiphlogistika (z.B. Diclofenac oder Tiaprofensäure), Analgetika (z.B. Paracetamol oder Flupirtin) oder Muskelrelaxantien eingesetzt. Physiotherapie und gelenkschonende Bewegungen können die Entzündungs- und Schmerzbekämpfung unterstützen und zur muskulären Kräftigung beitragen. Gewichtsreduktion und Gelenkschutzmaßnahmen wie z.B. Stöcke, Pufferabsätze oder Schuhranderrhöhungen tragen zur Entlastung des Gelenkes bei. Knorpelschutzmittel, sogenannte Chondroprotektiva wie z.B. DMOAD (Disease-modifying Osteoarthritis Drugs) und SADOA (Slow-acting Drugs in Osteoarthritis) sollen die Zerstörung von Knorpel aufhalten, was jedoch bisher wissenschaftlich noch nicht eindeutig belegt werden konnte. Gesichert ist jedoch, dass diese Medikamente eine symptomatische und schmerzlindernde Wirkung sowie funktionelle Verbesserungsmöglichkeiten aufweisen. Hyaluronsäure-Präparate verbessern die viskoelastischen Eigenschaften der krankhaft veränderten Synovia. Auch eine gewissenhafte Ernährung, bei der Fett und stark purinhaltige Nahrungsmittel vermieden werden sollten, trägt zum positiven Verlauf der Arthrose bei [40].

Es gibt verschiedene Möglichkeiten des chirurgischen Eingriffs. Für leichte und mittelschwere Arthrosen stehen Eingriffe wie z.B. Lavage, Debridement, Abrasio und Synovektomie zur Verfügung, durch die häufig eine Beschwerdeabnahme erreicht werden kann. Bei stärkeren, degenerativen Veränderungen müssen Maßnahmen wie Osteotomien, Behebungen von Achsenfehlstellungen oder sogar der Einsatz eines Kunstgelenkes getroffen werden [40]. Die künstliche Endoprothese wird jedoch erst für Patienten, die das 60. Lebensjahr möglichst überschritten haben, empfohlen. Bei jüngeren Patienten ist die Behandlung problematisch, da die Endoprothesen nur eine Haltbarkeit von 10-15 Jahren besitzen. Durch diese limitierte Versorgung ist der Patient häufig dann doch auf den Rollstuhl angewiesen [23].

Die Erforschung zukünftiger Therapien der Arthrose geht vor allem in Richtung Proteinase- und Zytokinhemmer, die die Entzündungsmediatoren der

Synovialschleimhaut und der Knorpelzellen beeinflussen, außerdem in Richtung der Wachstumsfaktoren, die das Knorpelwachstum und die Reparaturen beeinflussen, und in Richtung der Modulatoren des Knochenumbaus, wodurch die Knorpelzerstörung verhindert werden soll [41].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Obwohl es in der Vergangenheit bereits zahlreiche Forschungsprojekte gab, um die Therapie der Arthrose zu optimieren, gibt es derzeit keine kausale Therapie. Ein Grund hierfür könnte sein, dass es noch immer Lücken in der vollständigen Aufklärung der Ätiologie und der Pathogenese der Arthrose gibt.

Immer mehr Forschungsprojekte beschäftigen sich mit der möglichen wichtigen Rolle von Leptin bei der Entstehung und dem Voranschreiten einer Arthrose.

In dieser Studie ergibt sich die Überlegung, ob es erhöhte Leptinspiegel bei einer Arthrose gibt. Dass es einen möglichen Zusammenhang zwischen erhöhtem Leptinspiegel und Arthrose gibt, ergibt sich aus der Beziehung zwischen einem hohen Body Mass Index und einem wachsenden Risiko für Arthrose.

So soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, inwieweit Leptinspiegel in Synovialflüssigkeiten mit klinischen Parametern wie Arthroestadium, Geschlecht, Alter und BMI korrelieren und dadurch gegebenenfalls einen möglichen Einfluss auf das Voranschreiten einer Arthrose nehmen können.

Des Weiteren stellt sich die Frage, inwieweit Leptin eine Rolle bei der Knorpeldegeneration spielt. Die Expression von Leptin korreliert mit der Knorpeldegradation bei Patienten mit einer Osteoarthrose. Da der Abbau von Knorpelmatrix hauptsächlich von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) abhängt, in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung sind die Kollagenasen MMP-1 und MMP-13, aber auch Stromelysin (MMP-3), sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Leptin einen Einfluss auf die Expression bzw. Sekretion dieser MMPs hat. Es soll untersucht werden, inwieweit Leptin die Sekretion von wichtigen MMPs durch arthrotische Synovialfibroblasten reguliert. Dabei ist auch

zu klären, ob Leptin über die MMP inhibierenden Faktoren TIMP-1 und TIMP-2 Einfluss auf die MMP-Aktivität nimmt.

2 Material und Methode

Der Antrag für die klinischen Studien und für die Verwendung des Patientenmaterials wurde von der Ethikkommission unter der Nummer 1 I fuch am 10.10.2000 genehmigt.

2.1 Probenmaterial und Patienten

Das Probenmaterial bestand aus steril entnommener Synovialflüssigkeit aus dem oberen Rezessus von 43 Patienten mit klinisch und radiologisch gesicherter Osteoarthritis des Kniegelenks, bei denen die Versorgung mittels Totalendoprothesen indiziert war. Zusätzlich wurde Synovialgewebe von 5 Patienten entnommen. Die Entnahme des Probenmaterials erfolgte durch die Klinik und Poliklinik für Orthopädie des Universitätsklinikums Münsters während endoprothetischer Versorgung.

2.2 Klinische Parameter

Bei jedem einzelnen Patienten wurden folgende klinische Parameter bestimmt: Alter, Geschlecht, radiologische Klassifikation und BMI (Body Mass Index).

2.2.1 Einteilung unter radiologischen Kriterien

Die Patienten, denen das Material entnommen wurde, wurden anhand von Röntgenbildern nach der Einteilung von Kellgren and Lawrence [48] klassifiziert.

Grad	Ausprägung	Radiologische Kriterien
0	keine	Keine Merkmale einer Osteoarthrose
1	zweifelhaft	minimale Osteophyten mit zweifelhafter klinischer Signifikanz
2	minimal	deutliche Osteophyten ohne Beeinträchtigung des Gelenkspaltes
3	mäßig	mäßige Verminderung des Gelenkspaltes
4	stark	Ausgeprägte Beeinträchtigung des Gelenkspaltes mit subchondraler Sklerose

Abbildung 2.1: Röntgenologische Klassifikation nach Kellgren and Lawrence [47]

2.2.2 Bestimmung des Body Mass Index (BMI)

Bei jedem Patienten wurde das Gewicht und die Körpergröße bestimmt und anschließend anhand folgender Formel der BMI errechnet:

$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht in Kilogramm}}{(\text{Körpergröße in Metern})^2}$$

2.3 Verfahrensbeschreibung zur Herstellung der Monolayerkultur

2.3.1 Isolation und Expansion der Synovialfibroblasten

Synovialgewebe, das steril entnommen wurde, wurde zerkleinert und mit 0,5%igen Trypsin-/ 0,2 %iger EDTA-Lösung (PAA) enzymatisch für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Die so erhaltene Zellsuspension wurde anschließend durch 100µm Nylonsiebe filtriert und bei 500g für 10 Minuten zentrifugiert um verbliebene Gewebereste zu entfernen. Die auf diese Art und Weise gewonnen Zellen wurden in DMEM/High Glucose, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 0,25 µg/ml Amphotericin (P/S/A) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf Zellkulturflaschen gegeben. Die Expansion der Synovialfibroblasten erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Ausbildung einer adhärenen Monolayerschicht. Mit Trypsin-EDTA wurden die Zellen zur weiteren Subkultivierung vom Flaschenboden gelöst, anschließend zur Neutralisierung des Trypsins mit Komplettmedium 1:6 verdünnt und nachfolgend zweimal mit serumfreien Medium gewaschen.

2.3.2 Stimulation der Synovialfibroblastenkulturen

Zur Stimulation wurden die Synovialfibroblasten auf 24-Loch(-well)platten mit einer Dichte von $0,4 \times 10^5$ Zellen/well ausplattiert. Nachdem eine Semikonfluenz erreicht wurde (etwa 70%), wurden die Zellen erst für 24 Stunden in DMEM/5% FCS und dann für weitere 24 Stunden in serumfreien DMEM/0,2 % BSA kultiviert. Dann erfolgte die Stimulation der Synovialfibroblasten mit rekombinantem Leptin in den Konzentrationen 10, 20, 40 und 80 ng/ml (R&D Systems, Minneapolis, USA) in serumfreien Medium. Als positive Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich mit IL-1β (Interleukin-1β) und TNF-α (Tumornekrosefaktor-α) (10 ng/ml) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als

Kontrolle. Nach 48-stündiger Stimulation wurden die Überstände abgenommen, anschließend für 4 Minuten bei 10000g zentrifugiert, dann in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Analyse erfolgte bei -80°C.

Aus den Synovialfibroblasten, die auf den Platten verblieben sind, wurde mittels spezifischem RNA-Isolationsverfahren die Gesamt-RNA extrahiert.

2.4 Methode der Analytik

2.4.1 Zytokin-Arrays

Mit Hilfe von Zytokin-Arrays ist es möglich in relativ kurzer Zeit einen Überblick über die Sekretionsspiegel spezifischer Zytokine in unterschiedlichen Flüssigkeiten zu erhalten. Durch vergleichende Untersuchungen ist es zusätzlich möglich, Konzentrationsunterschiede semiquantitativ zu bestimmen. Es wurde der RayBio™ Human Cytokine V der Firma RayBiotech, Inc. (Norcross, GA, USA) verwendet. Die Durchführung der Bestimmungen erfolgte exakt nach Herstellerangaben.

Verwendete Geräte und Reagenzien:

- RayBio™ Human Cytokine Array Membranen* (2/4/8 Membranen)
- Biotin-konjugierte Anti-Cytokine* (10/20/38 µl)
- 1000x HRP-konjugiertes Streptavidin* (24 µl)
- 2x Blockpuffer* (15/25ml)
- 20x Waschpuffer I* (10/20ml)
- 20x Waschpuffer II* (10/20ml)
- 2x Zelllysepuffer* (10/20ml)

- Detektionspuffer C* (3/5ml)
- Detektionspuffer D* (3/5ml)
- 8-well Tray*
- destilliertes Wasser
- Rüttler
- Plastikfolie
- Kodak x-omat AR Film (REF 165 1454) und Filmentwickler

*Im Materialbestand des RayBio™ Human Cytokine Array der Firma RayBiotech, Inc. enthalten

Versuchsdurchführung:

Mit Hilfe der Zytokin-Arrays wurden Synovialflüssigkeiten von insgesamt 10 Patienten analysiert. Davon hatten 2 Patienten eine Osteoarthritis des Stadiums 1, 2 Patienten das Stadium 2, 2 Patienten das Stadium 3 und 4 Patienten das Stadium 4. Aufgrund der unterschiedlichen und teilweise hohen Viskosität der Synovialflüssigkeiten wurden die Proben zur Vorbereitung zunächst mit 300 µg/ml Hyaluronidase für 45 Minuten bei 37°C verdaut und anschließend 5 Minuten bei 14000 Umdrehungen abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die folgenden Schritte wurden der Reihe nach durchgeführt:

1. Die Membranen wurden in die dafür vorgesehenen Schalen gelegt.
2. 2 ml 1x Blockpuffer wurde hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
3. Der Blockpuffer wurde abgenommen. Anschließend wurde die Membran mit 1 ml der Probe für 16 Stunden bei 4°C inkubiert.
4. Die Probe wurde abgenommen. Anschließend wurde mit 2ml des 1x Waschpuffers I 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Dieser Waschvorgang wurde 2 Mal wiederholt. 20x Waschpuffer I wurde mit H₂O verdünnt.

5. Mit 2 ml des 1x Waschpuffers II wurde ebenfalls 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Dieser Waschvorgang wurde 1 Mal wiederholt. 20x Waschpuffer II wurde mit H₂O verdünnt.
6. Die Antikörperlösung wurde vorbereitet, indem 4 µl des Biotin-konjugiertem Antikörper mit 996 µl 1x Blockpuffer gemischt wurden.
7. 1 ml des verdünnten Biotin-konjugierten Antikörper wurde auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert.
8. Es folgten die Waschvorgänge wie unter Punkt 4 und 5 beschrieben.
9. 2 µl des HRP-konjugiertem Streptavidin wurde mit 1998 µl des 1x Blockpuffers gemischt. Von diesem verdünnten HRP konjugiertem Streptavidin wurden 0,5 ml auf die Membran gegeben.
10. Anschließend wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
11. Es folgten die Waschvorgänge wie unter Punkt 4 und 5 beschrieben.
12. 500 µl des 1x Detektionspuffers C werden mit 500 µl des 1x Detektionspuffers D gemischt. Die Membran wurde in die Lösung gelegt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert.
13. Die Membranen wurden von Überschuß befreit und mit Whatman-Papier für ein paar Sekunden getrocknet, anschließend auf Whatman-Papier gelegt und mit einer Plastikfolie abgedeckt.
14. Die Membranen wurden mit Röntgenfilmen belegt, welche nach unterschiedlichen Expositionszeiten (30 Sek.; 1, 2, 5, 15 Min.; über Nacht) entwickelt wurden.

2.4.2 Expressionsanalysen (RT-PCR)

2.4.2.1 Isolation von Gesamt-RNA

Um die Gesamt-RNA aus den Synovialfibroblasten zu isolieren, wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und dann direkt auf den 24-well-Platten lysiert. Die Gesamt-RNA wurde mittels RNeasy-Isolations-Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande) extrahiert. Dies erfolgte genau nach Vorgaben des Herstellers.

2.4.2.2 PCR

Für die Analysen der Genexpression wurde die Gesamt-RNA vorerst in cDNA umgeschrieben.

Die cDNA-Synthese von 500 ng RNA erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Dabei wurden „Random Hexamere“ und M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega, Madison, WI, USA) verwendet. Die Transkripte von Leptin und Leptinrezeptor sowie von GAPDH wurden mittels spezifischer Primer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) (siehe Abbildung 2.2) und Taq-DNA-Polymerase (Promega) in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) amplifiziert. Die Zyklenzahl betrug 35 bei folgender Einstellung der Zyklen: 94°C für 1 Minute, 60°C für eine Minute, 72°C für 1 Minute; initial 94°C für 3 Minuten; terminal 72°C für 10 Minuten. Als interne Kontrolle zur Überprüfung der RNA-Integrität und cDNA-Synthese diente die Amplifikation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die amplifizierten PCR-Produkte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel separiert und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt. Zum Schluß erfolgte die Detektion und fluorometrische Auswertung mit Hilfe eines Geldokumentations- und Analysesystems (GelDoc 1000, QuantityOne; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Als Größenstandard wurde GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas, Burlington, Canada) verwendet.

Primer	Sequenzen	Referenzen
LEPTIN sense	5'-GATGACACCAAAACCCTCATC-3'	Castelucci ad al. [14]]
LEPTIN antisense	5'-GGCCACCACCTCTGTGGAGTA-3'	
LEPTIN Rez.sense	5'-CAGAAGCCAGAAACGTTTGAG-3'	Glasow ad al. [35]
LEPTIN Rez.antisense	5'-AGCCCTTGTTCTTCACCAGT-3'	
GAPDH-Sense	5'-TCCTGCACCACCAACTGCTT-3'	Kaneto ad al. [47]
GAPDH-Antisense	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

Abbildung 2.2: Transkripte der verwendeten Primer

2.4.3 ELISA

Um das Sekretionsverhalten der Synovialfibroblasten quantitativ zu bestimmen, wird im Allgemeinen eine immunochemische Messmethode herangezogen, da diese in der Lage ist, auch sehr niedrige Konzentrationen des zu messenden Enzyms zu erfassen. Es werden die Konzentrationen der einzelnen Kulturüberstände der Stimulationsansätze mittels ELISA bestimmt. Bei diesem Laborverfahren handelt es sich um einen enzymmarkierten (**EnzymLinked**) Nachweis, der die Bindung des Primärantikörpers, welcher immunologisch an die feste Phase gebunden ist (**ImmunoSorbent**), mit einem Antigen der Probenlösung (**Assay**) voraussetzt. Die Durchführung der ELISAs erfolgte exakt nach den Herstellerangaben.

2.4.3.1 MMP-/TIMP-ELISA

Es wurden Kits des BiotrakTM ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech (Piscataway, NY, USA) verwendet.

Vor der Probenauftragung wurden die Überstände bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend in Doppel-Ansätzen in die ELISA-Kits eingebracht.

Verfahrensbeschreibung der Analytik**Verwendete Geräte und Reagenzien:**

- Mikrotiterplatte* mit 96 wells (12 x 8 well strips), die mit Primärantikörper gegen die jeweiligen MMPs/TIMPs beschichtet sind
- Probenpuffer* (Assay buffer), zusammengesetzt aus: Phosphatpuffer, Natriumchlorid, Rinderalbumin und wahlweise EDTA und TweenTM 20, zur Verdünnung der Standardlösungen, der Proben und z.T. des Peroxidasekonjugat

- Standardlösungen* mit standardisierten Konzentrationen des lyophilisierten Antigens (MMP/TIMP)
- Meerrettichperoxidasekonjugierte monoklonale und polyklonale Antikörper* (Peroxidasekonjugat)
- polyklonaler Zweitantikörper*, bei dem MMP-1 ELISA-kit: rabbit-Anti-MMP-1
- Waschlösungen* mit Phosphatpuffer und TweenTM 20
- TMB-Substrat* als Farbindikator (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)
- Destilliertes Wasser
- Spektrophotometer mit den Messbereichen 450 nm und 630 nm
- 1 molare Schwefelsäure als Stopperlösung
- Mikrotiterplattenschüttler

* im Materialbestand des BiotrakTM ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech enthalten

Versuchsdurchführung:

Zunächst wurden Testmessungen durchgeführt, indem durch die aus den Probenvorbereitungen erhaltenen Überständen verschiedener Patienten, Testreihen mit unterschiedlichen Verdünnungsansätze zur Ermittlung der zu erwartenden Konzentrationen durchgeführt wurden. Die Ansätze wurden folgendermaßen verdünnt in die ELISA-kits eingegeben:

MMP-1-kit: unverdünnt

MMP-3-kit: Leptin in der Verdünnung 1:2

IL-1 β in der Verdünnung 1:20

TIMP-1-kit: Leptin in der Verdünnung 1:50

TIMP-2-kit: unverdünnt.

Es wurden Verdünnungen zur Bestimmung der einzelnen MMPs und TIMPs ausgewählt, die im linearen Messbereich der entsprechenden ELISA-kits lagen,

d.h. innerhalb der jeweiligen Standardkurven. Die unterschiedliche Spezifität und Sensitivität ist in nachfolgender Tabelle angegeben:

ELISA-kit	Spezifität	Sensitivität
MMP-1	ProMMP-1, MMP-1, MMP-1/TIMP-Komplex	bis 1,70 ng/ml
MMP-3	ProMMP-3, MMP-3, MMP-3/TIMP-Komplex	bis 2,35 ng/ml
TIMP-1	*TIMP-1-Komplex mit aktivem MMP-1,-2,-3,-9, ProMMP-9	bis 1,25 ng/ml
TIMP-2	*TIMP-2-Komplex mit aktivem MMP-1,-2,-3,-7,-8,-9	bis 3,00 ng/ml

*freies, nicht gebundenes TIMP-1 bzw. TIMP-2

Abbildung 2.3: Spezifität und Sensitivität der ELISA-kits des Biotrak™ ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech

Es gilt für alle MMP-ELISA-Kits, dass sie kein α_2 -makroglobulingebundenes Enzym erfassen. Sie weisen keine Kreuzreaktionen zu anderen Enzymen der MMP-/TIMP-Familie auf.

Nachdem die Proben und das Material auf Raumtemperatur äquilibriert worden sind und die Standardverdünnungsreihen und die Reagenzien nach den Angaben des Herstellers vorbereitet worden sind, begann die eigentliche Versuchsreihe mit folgenden Arbeitsschritten:

1. Alle ELISA-kits: 100 μ l der unverdünnten Probenlösungen und 100 μ l der seriell verdünnten Standardreihe wurden in den ELISA eingebracht.
TIMP-2: Bei diesem ELISA-kit wurden die Lösungen zuvor mit 100 μ l Peroxidasekonjugat (anti-TIMP-2-HRP Antikörper) in Tubes gevortext.
2. Die Mikrotiterplatte wurde abgedeckt und bei Raumtemperatur für exakt 2 Stunden auf einem Mikrotiterplattenschüttler gelagert.
MMP-3: Lagerung für exakt 1 Stunde bei 4°C

3. Gewaschen wurden die wells, indem sie mit Waschlösung gefüllt wurden und dann durch mehrmaliges Ausschlagen auf Zellpapier gründlich entleert wurden; dies wurde 4x hintereinander wiederholt.
4. MMP-1: 100 µl Antiserum (rabbit-Anti-MMP-1) wurden in die wells pipettiert und für 2 Stunden mit dem nun gebundenen Antigen (MMP-1) der Probe inkubiert.
MMP-3: 100 µl 4°C kaltes Peroxidasekonjugat (anti-MMP-3-HRP Antikörper) wurde in die wells pipettiert und für 2 Stunden mit dem nun gebundenen Antigen (MMP-3) der Probe bei 4°C inkubiert.
TIMP-1: 100 µl Peroxidasekonjugat (TIMP-1-HRP Antikörper) wurde in die wells pipettiert und für 2 Stunden mit dem nun gebundenen Antigen (TIMP-1) der Probe inkubiert.
TIMP-2: -
5. Waschgang, siehe 3.
6. nur MMP-1: 100 µl Peroxidasekonjugat (donkey anti-rabbit-HRP Antikörper) wurde in wells gegeben und für 1 Stunde inkubiert.
Anschließend Waschgang, siehe 3.
7. In die wells wurden 100 µl TMB-Substrat (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin) pipettiert. Anschließend folgte eine 30 minütige Reaktionsphase bei Raumtemperatur. (Farbumschlag)
8. Durch die Zugabe von 100 µl 1-molarer Schwefelsäure wurde die Reaktionsphase gestoppt. Die deutlich bläulich gefärbte Lösung schlug sofort in eine gelbe Lösung um.
9. Die Messwerte der Proben- und Standardlösungabsorbanzen wurden umgehend mittels eines Spektrophotometers bei 450 nm und 530 nm erhoben (Referenzfilter).

2.4.3.2 Leptin-ELISA

Bei diesem ELISA wurde das human Leptin TiterZyme[®]EIA der Firma Assay Designs, Inc. (Michigan, USA) verwendet.

Zur Probenvorbereitung der Synovialflüssigkeiten wurden die Proben zunächst mit 300µg/ml Hyaluronidase für 45 Minuten bei 37°C verdaut und anschließend 5 Minuten bei 14000 Umdrehungen abzentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß gegeben.

Verwendete Geräte und Reagenzien:

- Mikrotiterplatte* mit 96 wells, die mit gegen Leptin spezifischen Antikörper beschichtet sind
- Gekennzeichneter Kaninchenantikörper* gegen Leptin konjugiert mit Meerrettichperoxidase
- Probenpuffer* (Assay buffer), der Phosphatpuffer enthält
- Verdünnter gekennzeichneter Antikörper*
- Waschlösungskonzentrat* mit Phosphatpuffer
- Standardlösung*, welche rekombinantes Leptin enthält
- Substratpuffer*, der bereits eine Lösung von Phosphatpuffer zur direkten Benutzung enthält
- Peroxidaselösung*, die eine 0,01%ige Lösung von hydrogenem Peroxid in Wasser enthält
- TMB Tabletten* als Farbindikatoren
- 1 molare Schwefelsäure als Stopperlösung*
- Destilliertes Wasser
- 37°C Inkubator
- Spektrophotometer mit dem bevorzugten Messbereich 450 nm und möglichen Korrekturen zwischen 570 nm bis 590 nm.

*im Materialbestand des TiterZyme[®]EIA der Firma Assay designs, Inc. enthalten

Versuchsdurchführung:

Zunächst wurden die einzelnen Reagenzien vorbereitet:

- (1) Waschlösung: 25 ml des Waschlösungskonzentrats wurde mit 975 ml destilliertem Wasser verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.
- (2) Standardlösung: 500 µl destilliertes Wasser wurden der Standardlösung zugegeben. In 7 beschriftete Reagenzgläser wurden jeweils 220 µl des Probenpuffers pipettiert. Anschließend wurde eine 1:1 Verdünnung der Standardlösung aus Reagenzglas Nr.1 seriell verdünnt, so dass sie dann Leptinkonzentrationen von 12500, 6250, 3125, 1562, 781, 391 und 195 pg/ml enthielten. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.
- (3) Substrate: Zunächst wurden 2,5 ml des Substratpuffers mit einer TMB Tablette gemischt. Als sichergestellt war, dass die Tablette komplett aufgelöst war, wurde 2,75 ml Peroxidaselösung hinzugegeben und gut gemischt.

Nachdem alle Reagenzien vorbereitet und auf Raumtemperatur gebracht worden waren, wurde folgendermaßen fortgefahren:

1. 100 µl des Probenpuffers wurde in den S0 (0pg/ml Standard)Well pipettiert.
2. 100 µl der Standardlösung Nr.1 bis Nr.7 wurden in die jeweils passenden wells pipettiert.
3. 100 µl der zu untersuchenden Proben wurden in die passenden wells pipettiert.
4. Durch leichtes Bewegen der Mikrotiterplatte wurde der Inhalt gemischt.
5. Anschließend wurde die verschlossene Mikrotiterplatte bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.
6. Der Inhalt der Wells wurde geleert und jedes Well wurde mit 400 µl Waschlösung gewaschen. Dieser Vorgang wurde 6 mal

wiederholt. Schließlich wurden die Wells von der Waschlösung geleert.

7. 100 µl des konjugierten Antikörper wurde in jedes Well pipettiert, ausgenommen das leere Well.
8. Die verschlossene Mikrotiterplatte wurde bei 4°C für 30 Minuten inkubiert.
9. Der Waschvorgang (siehe 6.) wurde 9 mal wiederholt.
10. 100 µl der Substratlösung wurde in jedes Well pipettiert.
11. Anschließend folgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln.
12. 100 µl der Stopplösung wurde in jedes Well pipettiert.
13. Die Messwerte der Proben- und Standardlösungsabsorbanzen wurden umgehend mit einem Spektrophotometer bei 450 nm, 570 nm und 590 nm erhoben.

2.4.4 Bestimmung der Proteaseaktivität (SDS-PAGE-Gelatine-Zymographie)

Die Methodik der Zymographie beruht auf der Bestimmung der Proteaseaktivität. Dazu wurden die Zellkulturüberstände aus den einzelnen Stimulationsexperimenten mit einem Probenpuffer (4mM EDTA, 4% SDS, 40% Glycerol, 0.04% Bromophenol blue, 40mM Tris/HCl, pH 6,8) im Verhältnis 1:4 versetzt. Die Auftrennung der einzelnen MMPs erfolgte elektrophoretisch in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel (Sodium Dodecyl Sulfate) mit 0.1% Gelatine. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zweimal für 30 Minuten in 2,5%igem Triton-X 100 gewaschen, um das SDS zu entfernen. Anschließend wurde das Gel noch mehrfach mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann erfolgte der enzymatische Abbau der Gelatine durch die MMPs für 16 Stunden bei 37°C in 50mM Tris/HCl pH 8,5 mit 5mM CaCl₂. Zum Sichtbarmachen des Gelatineabbaus wurde das Gel am Ende mit Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva) gefärbt. Die Dokumentation und Analyse erfolgte

nach verschiedenen Entfärbungsschritten mit Hilfe des Gel Doc 1000-Systems (Bio-Rad Laboratories).

2.5 Statistische Analyse

Um unabhängige Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney U-Test angewendet. Dies ist ein auf den sogenannten Wilcoxon-Test basierender Rangsummentest für den Vergleich unabhängiger Stichproben bei nicht normalverteilter Grundgesamtheit [88].

Signifikanzen bei Stimulationsexperimenten mit verschiedenen Konzentrationen von Leptin wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Dies ist ebenfalls ein nichtparametrischer Test, mit dem geprüft werden kann, ob zwei Stichproben der gleichen Gesamtheit angehören [90].

Nachfolgend wurde mit einem multiplen Vergleichstest gezeigt, welche Gruppen untereinander Signifikanzen aufwiesen.

Die Korrelationen unterschiedlicher Merkmale der Patienten wurden mit dem Rangkorrelations-Koeffizienten nach Spearman berechnet.

In dieser Arbeit wurde das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ angesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Parameter

3.1.1 Alter und Geschlecht

Es lag Probenmaterial von insgesamt 43 Patienten vor, von denen 19 Patienten dem männlichen Geschlecht angehörten und 24 dem weiblichen. Die Patienten waren im Alter von 32 bis 87 Jahren, wobei 50% der Altersgruppe von 60 bis 75 Jahren angehörten. Das Durchschnittsalter lag bei 63,72 Jahren.

3.1.2 Radiologischen Kriterien

Die Patienten des Stadiums 1 und 2 wurden aufgrund von sehr geringen Patientenzahlen in diesen Stadien zu einer Gruppe zusammengefasst, so dass insgesamt 3 Patientengruppen gebildet wurden. Die **Gruppe Nr. 1** bestand aus 8 Patienten, davon 5 männliche und 3 weibliche Patienten, die alle eine Osteoarthritis des Stadiums 1 oder 2 hatten. In die Altersgruppe von 30-40 Jahren fielen 2 Patienten, von 40-50 Jahren ebenfalls 2 Patienten, von 50-60 und 60-70 Jahren jeweils 1 Patient und von 70-80 Jahren 2 Patienten. Die **Gruppe Nr. 2** bestand aus 14 Patienten mit einer Osteoarthritis des Stadiums 3, davon 6 männliche und 8 weibliche Patienten. 2 Patienten fielen in die Altersgruppe von 40-50 Jahren, 2 Patienten von 50-60 Jahren, 3 Patienten von 60-70 Jahren, 5 Patienten von 70-80 Jahren und 2 Patienten waren über 80 Jahre alt. Die **Gruppe Nr. 3** bestand aus 21 Patienten, davon 8 männliche und 13 weibliche Patienten

mit dem Arthrosestadium 4. In die Altersgruppe von 40-50 Jahren fielen 2 Patienten, von 50-60 Jahren ebenfalls 2 Patienten, von 60-70 Jahren 10 Patienten, von 70-80 Jahren 6 Patienten und ein Patient war über 80 Jahre alt.

3.1.3 Body Mass Index

Der Body Mass Index konnte für insgesamt 41 Patienten, davon 18 männliche und 23 weibliche Patienten, errechnet werden. Dabei ergaben sich Werte zwischen 24,24 und 40,64 kg/qm². Davon hatten über 50% der Patienten einen BMI zwischen 29 und 35 kg/qm². Der Durchschnittswert lag bei 29,81 kg/qm². Auffallend war, dass der BMI der weiblichen Patienten insgesamt höher war, als der der männlichen Patienten.

3.2 Zytokin-Arrays

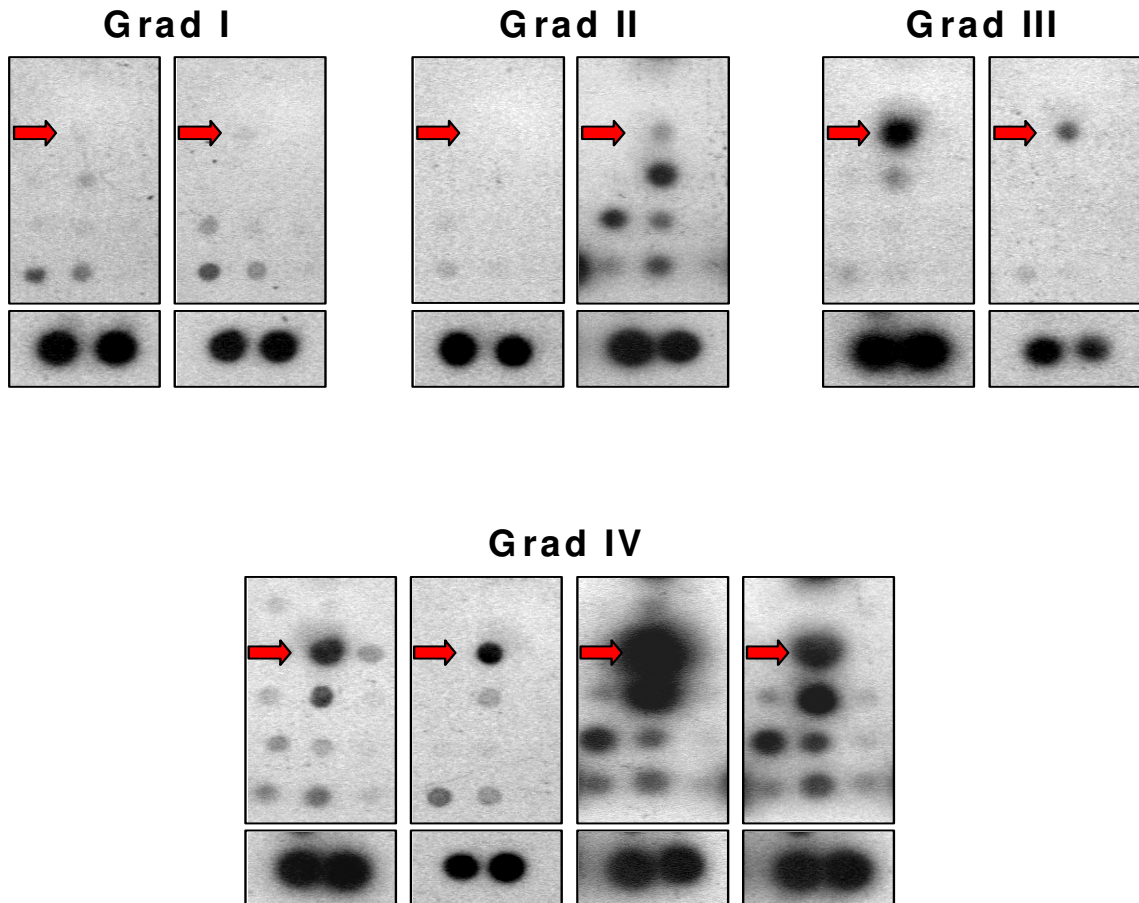


Abbildung 3.1: Stadienabhängige Erhöhung der Leptinspiegel in Synovialflüssigkeiten bei insgesamt 10 Patienten

Pfeil: Leptinspots

Unterer Abschnitt: positive Kontrollen

Als Initialversuche wurden zunächst Zytokin-Arrays durchgeführt, um festzustellen, ob wie bei Patienten mit rheumatoiden Arthritis auch, bei Osteoarthritispatienten Leptin ebenfalls erhöht ist. Es wurden Synovialflüssigkeiten von insgesamt 10 Patienten untersucht. Bei beiden

Patienten mit einer Osteoarthritis des Stadiums 1 konnte keine nennenswerte Erhöhung des Leptins festgestellt werden. Bei den Patienten des Stadiums 2 war bei einem keine, bei dem anderen eine leichte Erhöhung festzustellen. Beide Patienten mit dem Stadium 3 zeigten einen deutlichen Anstieg des Leptins, wobei dieser bei dem einen etwas ausgeprägter als bei dem anderen ausfiel. Alle vier Patienten mit dem Stadium 4 zeigten eine sehr deutliche Leptinerhöhung, wobei sich zwei Patienten als besonders deutlich hervorhoben. Insgesamt kann man sagen, dass in Abhängigkeit des Osteoarthritisgrades mit steigendem Grad eine augenscheinliche Erhöhung des Leptins festzustellen war.

3.3 Leptinspiegel in Synovialflüssigkeiten

Im Anschluß an die Initialversuche mit den Zytokin-Arrays wurden die Leptinspiegel in den Synovialflüssigkeiten quantitativ mittels ELISA bestimmt.

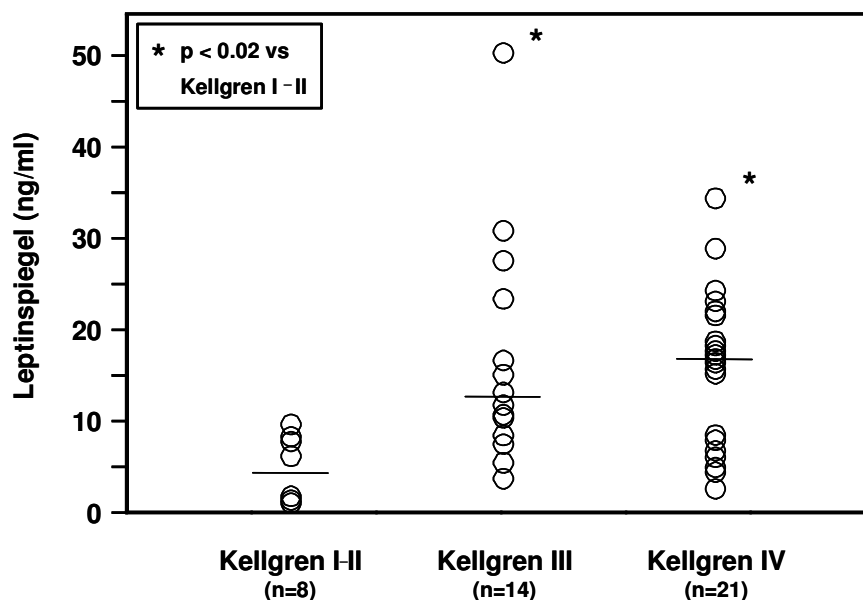


Abbildung 3.2: Leptinspiegel und Arthrosegrad in den Synovialflüssigkeiten.

Die dargestellten Werte zeigen Konzentrationen von Leptin. Zusätzlich ist in jeder Gruppe der Medianwert (Querbalken) angegeben. * = signifikant $p < 0,02$

Die graphische Darstellung in Abbildung 3.2 zeigt individuelle Leptinspiegel in den Synovialflüssigkeiten in Abhängigkeit der verschiedenen Schweregrade der Osteoarthritis, wobei die Patienten, wie bereits beschrieben, in drei Gruppen eingeteilt wurden.

In der Gruppe Nr. 1, in der die Patienten mit einer Osteoarthritis des Stadiums 1 und 2 zusammengefasst wurden, lag der Medianwert bei 4325,67 pg/ml und der IQB zwischen 1839,40 und 8091,94 pg/ml.

In der zweiten Gruppe, die aus Patienten des Stadiums 3 gebildet wurde, lag der Medianwert bei 12653,19 pg/ml und der IQB zwischen 9144,70 und 21896,96 pg/ml. Hier zeigte sich eine signifikante Veränderung im Sekretionsverhalten im Vergleich zur Gruppe Nr. 1 mit einer Signifikanz von $p < 0,02$.

Ebenfalls zeigte sich ein signifikant verändertes Sekretionsverhalten bei der Gruppe Nr. 3 im Vergleich zur Gruppe Nr. 1. Die Gruppe Nr. 3 wurde aus Patienten mit einem Osteoarthritisstadium 4 gebildet. Auch hier zeigte sich eine Signifikanz von $p < 0,02$ gegenüber der Gruppe Nr. 1. Der Medianwert lag bei dieser Gruppe bei 16782,95 pg/ml und der IQB zwischen 8126,36 und 21886,32 pg/ml.

Es wurde außerdem noch die Signifikanz im Sekretionsverhalten zwischen der Gruppe Nr. 2 und Nr. 3 untersucht, wobei hier jedoch keine Signifikanz festgestellt werden konnte.

3.4 Korrelation der Leptinspiegel in Synovialflüssigkeiten mit den klinischen Parametern

Um weitere Anhaltspunkte für den Zusammenhang von Leptin und der Osteoarthritis zu finden, wurde die Korrelation des Leptinspiegels mit verschiedenen klinischen Parametern mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht (siehe Abbildung 3.3). Als klinische Parameter wurden dabei das Geschlecht und das Alter der Patienten, die Zuordnung des Osteoarthritisstadiums nach der Klassifikation von Kellgren und Lawrence und der Body Mass Index gewählt.

Bei der Korrelation von Leptin mit dem Geschlecht wurden insgesamt 43 Patienten, davon 19 männliche und 24 weibliche Patienten untersucht. Bei den Männern lag der Medianwert der Leptinsekretion bei 6956,35 ng/ml und der IQB zwischen 4278,211 und 9791,88 ng/ml. Bei den Frauen lag der Medianwert bei 17476,97 ng/ml und der IQB zwischen 11608,27 und 23734,53 ng/ml. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,562. Daraus ergibt sich eine positive hoch signifikante Korrelation des weiblichen Geschlechts mit Leptin mit einer Signifikanz von $p < 0,01$.

Bei der Untersuchung der Korrelation zwischen den Stadien nach Kellgren und Lawrence und Leptin von insgesamt 43 Patienten kam ebenfalls eine signifikante Korrelation heraus. Hier lag das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,386.

Die Korrelation von Leptin und dem BMI von insgesamt 41 Patienten ist mit einem $p < 0,01$ hoch signifikant. Hier lag der Korrelationskoeffizient bei 0,465. Abbildung 3.4 verdeutlicht noch einmal den Zusammenhang zwischen der Höhe des BMI und der Leptinsekretion.

Zusätzlich wurde noch die Korrelation des Leptins mit dem Alter überprüft. Hier konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden.

		Geschlecht	Kellgren	BMI	Alter
Leptin	Korrelationskoeffizient	0,562**	0,386*	0,465**	0,253
	Signifikanz (2 seitig)	0,000	0,011	0,002	0.102
	N=Anzahl	43	43	41	43

Abbildung 3.3: Korrelationen von Leptin mit den klinischen Parametern

* : Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant

** : Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant

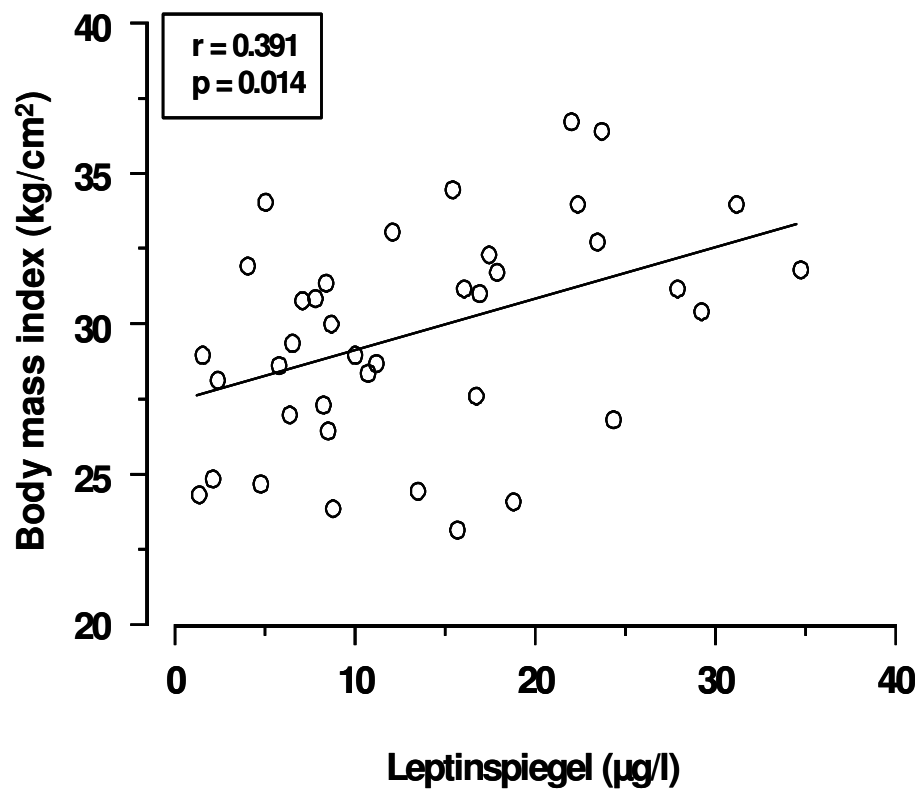


Abbildung 3.4: Zusammenhang BMI und Leptin

3.5 Expression von Leptin und Rezeptor in Synovialfibroblasten

Um festzustellen, ob Synovialfibroblasten Leptin und/oder den Rezeptor exprimieren, wurden PCRs für insgesamt 5 Patienten angefertigt. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase) wurde als interner Standard ebenfalls untersucht.

Wie in der graphischen Darstellung in Abbildung 3.5 zu sehen ist, exprimierten die Synovialfibroblasten aller Patienten sowohl Leptin als auch den Rezeptor, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Die Kontrolluntersuchung von GAPDH zeigte bei allen Patienten eine eindeutige Expression.

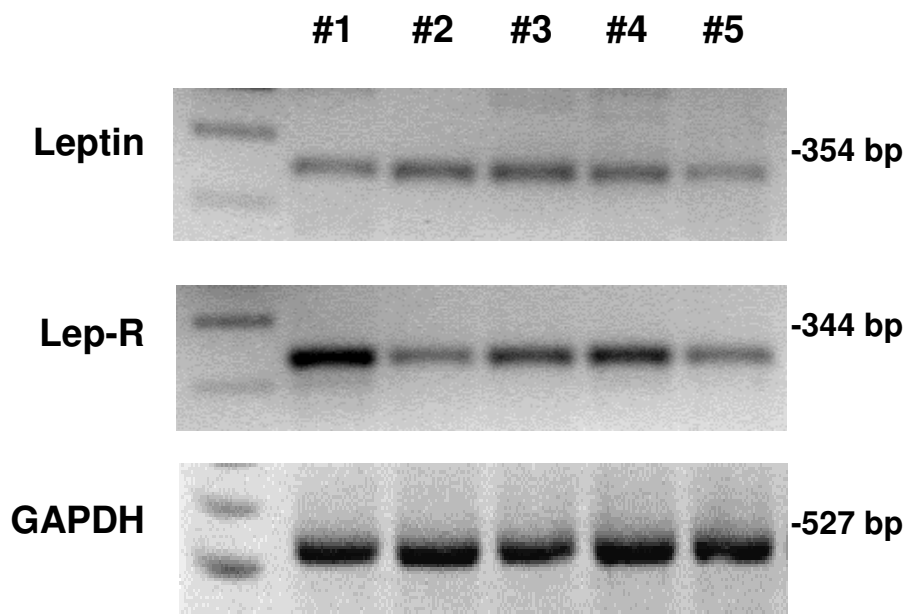


Abbildung 3.5: Expression von Leptin, Rezeptor und GAPDH bei insgesamt 5 Patienten

bp= Basenpaargröße

3.6 Effekt von Leptin auf die Proteaseaktivität von MMP

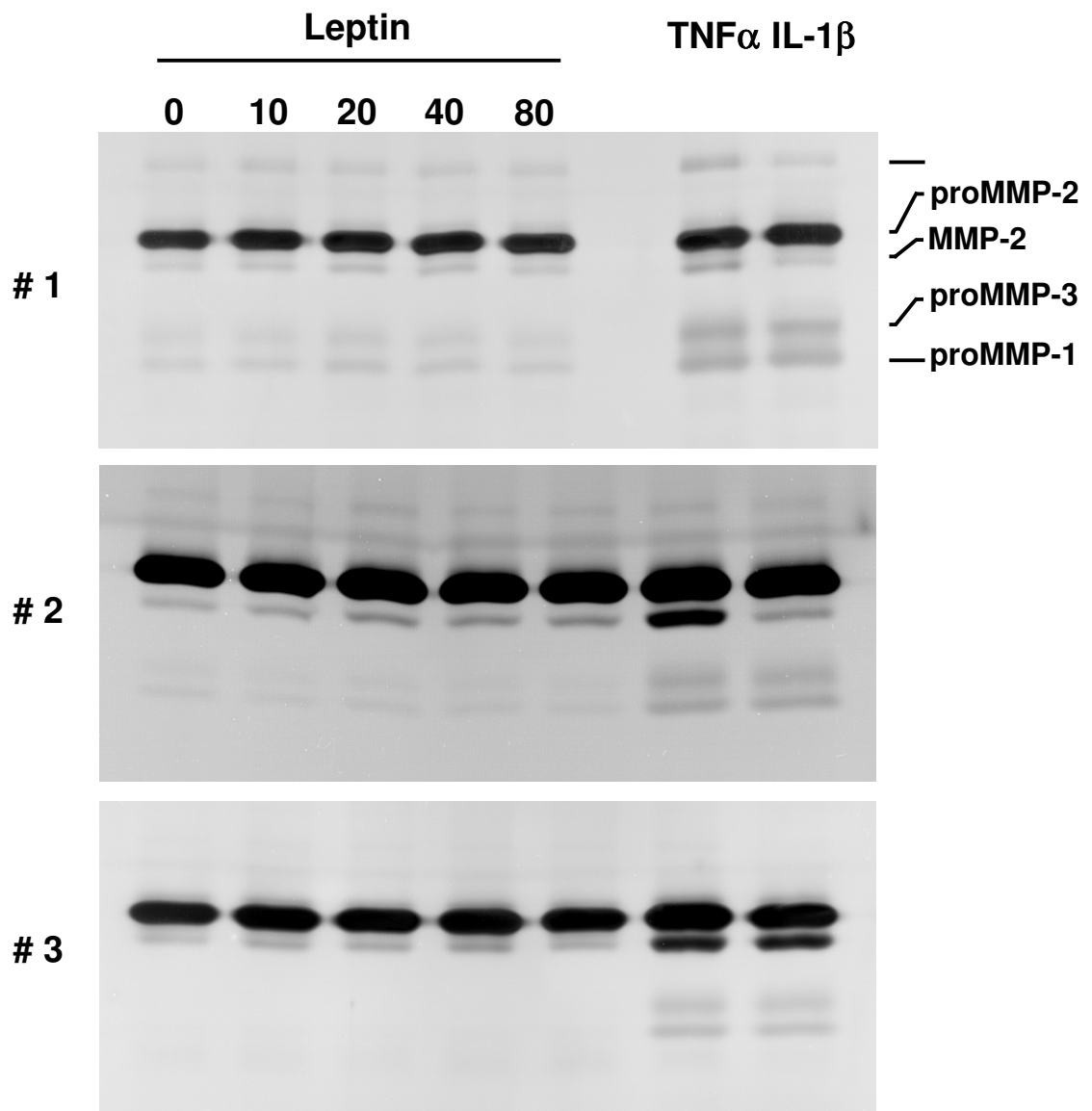


Abbildung 3.6: Aktivität sezernierter MMPs von Leptin-stimulierten Synovialfibroblasten unterschiedlicher Patienten

Als semiquantitativer Initialversuch wurden zunächst Zymogramme angefertigt. Mit Hilfe der Zymographie sollte festgestellt werden, inwieweit Leptin die proteolytische Aktivität von Synovialfibroblasten beeinflussen kann. Synovialfibroblasten wurden mit Leptin in den Konzentrationen 0, 10, 20, 40 und 80ng/ml stimuliert. Als Positivkontrollen wurden die Zytokine TNF α und IL-1 β , von denen bekannt ist, dass sie die Aktivität beeinflussen, in der Konzentration 10 ng/ml zugegeben. Um unterschiedliche MMPs beurteilen zu können, wurden sie elektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch konnten proMMP-1, MMP-2 und proMMP-3 beurteilt werden. Bei allen Leptinkonzentrationen konnte keine Erhöhung der Aktivität von MMP-1, -2 und -3 festgestellt werden. MMP-2 wurde sowohl von allen mit Leptin stimulierten, als auch mit TNF α und IL-1 β stimulierten Synovialfibroblasten gleichermaßen stark sezerniert. Hier ist jedoch hinzuzufügen, dass MMP-2 von allen Fibroblasten exprimiert wird. Bei den Positivkontrollen zeigten sich proMMP-1 und -3 als schwach induzierbar. Insgesamt kann man sagen, dass Leptin anscheinend keinen Effekt auf das Aktivitätsprofil von Synovialfibroblasten hat.

3.7 MMP-Sekretion

Um die semiquantitativen Ergebnisse der initialen Zymogramme zu verifizieren bzw. zu quantifizieren, wurde die Sekretion der MMPs mittels ELISA untersucht.

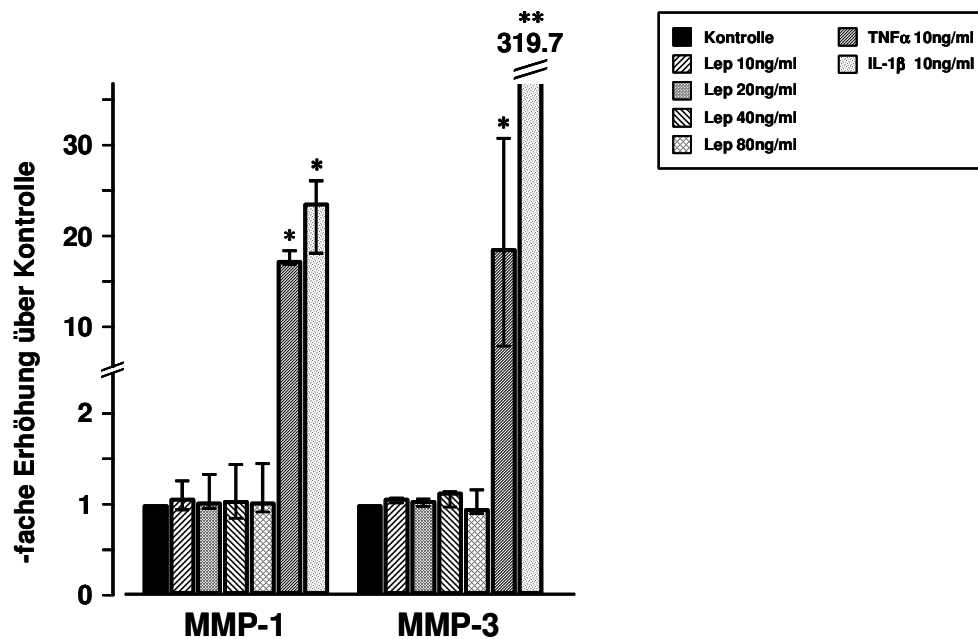


Abbildung 3.7: Einfluss von Leptin auf die Sekretion von MMP-1 und -3

3.7.1 MMP-1

Die zytokinvermittelte Stimulation mit TNF bzw. mit IL-1 β zeigte bei den Synovialzellen des Gewebes ein signifikant erhöhtes Sekretionsverhalten von MMP-1 ($p < 0,05$). Die mit den verschiedenen Leptinkonzentrationen stimulierten Zellen zeigten dagegen kein signifikant verändertes Sekretionsverhalten von MMP-1. Dies zeigt die graphische Darstellung der Medianwerte und Interquartilsbereiche in Abbildung 3.7. Die Medianwerte der Leptin vermittelten Erhöhung der MMP-1 Sekretion lagen zwischen 1,03 und 1,07-fach.

Eine effektivere Wirkung auf das Sekretionsverhalten der Synovialzellen zeigten die Stimulationen mit TNF bzw. mit IL-1 β . Bei TNF lag die Erhöhung bei 17,4-fach (IQB: 17, 28 - 18,61-fach). Bei IL-1 β zeigte sich eine 23,64-fache Erhöhung (IQB: 18,32 - 26,31-fach). Dadurch ergab sich sowohl bei der Stimulation mit TNF als auch mit IL-1 β eine Signifikanz von $p < 0,05$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe.

3.7.2 MMP-3

MMP-3 zeigte ein ähnliches Sekretionsverhalten wie MMP-1. Auch hier konnte durch Stimulation mit den verschiedenen Leptinkonzentrationen kein signifikant verändertes Sekretionsverhalten von MMP-3 festgestellt werden, was aus der graphischen Darstellung in Abbildung 3.7 zu entnehmen ist. Die Medianwerte für die Stimulation mit den verschiedenen Leptinkonzentrationen lagen zwischen einer 0,96 und 1,14-fachen Erhöhung.

Auch hier zeigten die Stimulationen mit TNF bzw. mit IL-1 β eine wesentlich effektivere Wirkung auf das Sekretionsverhalten der Synovialzellen. Bei TNF lag der Medianwert für die Erhöhung bei 18,68-fach (IQB: 8,11 - 30,97-fach). Daraus ergab sich eine Signifikanz von $p < 0,5$. Bei IL-1 β lag der Medianwert bei 319,69-facher Erhöhung (IQB: 128,31 - 415,30-fach). Daraus ergab sich sogar eine Signifikanz von $p < 0,01$ im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe.

Es konnte also sowohl für MMP-1 als auch für MMP-3 kein signifikant verändertes Sekretionsverhalten bei der Stimulation mit den verschiedenen Leptinkonzentrationen festgestellt werden.

3.8 TIMP-Sekretion

Um festzustellen, ob Leptin eventuell einen Einfluss auf die Inhibitoren der MMPs, den sogenannten TIMPs, haben könnte und dadurch ein Missverhältnis zwischen TIMPs und MMPs, wie es häufig bei Arthrosepatienten anzutreffen ist, hervorrufen könnte, wurden ebenfalls TIMP-ELISAs durchgeführt.

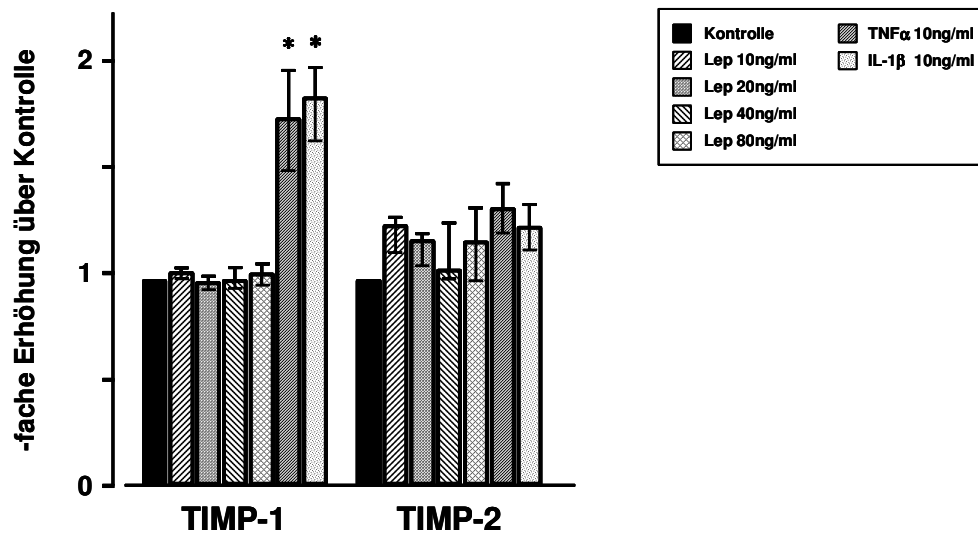


Abbildung 3.8: Einfluss von Leptin auf die Sekretion von TIMP-1 und -2

3.8.1 TIMP-1

Auch bei TIMP-1 konnte bei der Stimulation der Synovialzellen mit den verschiedenen Leptinkonzentrationen kein signifikant verändertes Sekretionsverhalten festgestellt werden. Wie aus der graphischen Darstellung in Abbildung 3.8 zu entnehmen ist, lagen die Medianwerte der leptinvermittelten Erhöhung der TIMP-1-Sekretion zwischen 0,99 und 1,04-fach.

Bei TIMP-1 zeigte sich ebenfalls eine effektivere Wirkung in der Sekretion bei Stimulation mit TNF bzw. mit IL-1 β . Bei der Stimulation mit TNF α lag die Erhöhung bei 1,76-fach (IQB: 1,52 - 1,99-fach) und bei der Stimulation mit IL-1 β bei 1,86-fach (IQB: 1,67 - 1,99-fach). Es ergab sich sowohl für TNF α als auch für IL-1 β auch hier eine Signifikanz mit $p < 0,5$ im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.8.2 TIMP-2

Wie bei TIMP-1 zeigte sich für die Stimulation mit den verschiedenen Leptinkonzentrationen bei TIMP-2 ebenfalls kein signifikant verändertes Sekretionsverhalten. Wie die graphische Darstellung in Abbildung 3.8 zeigt, lagen die Medianwerte zwischen 1,05 und 1,26-facher Erhöhung.

Anders als bei TIMP-1 zeigte sich jedoch das Sekretionsverhalten bei der Stimulation der Synovialzellen mit TNF bzw. IL-1 β . Bei der Stimulation mit TNF lag der Medianwert bei 1,34-fach (IQB: 1,23 - 1,46-fach) und bei IL-1 β lag bei 1,25-fach (IQB: 1,14 - 1,36-fach). Hier ergab sich wie bei der Stimulation mit den verschiedenen Leptinkonzentrationen kein signifikant verändertes Sekretionsverhalten.

Für die Sekretion von TIMP-1 und TIMP-2 konnte ebenfalls keine Regulation durch Leptin festgestellt werden.

4 Diskussion

Seit der Entdeckung von Leptin im Jahre 1994 nehmen Forschungsergebnisse und Literatur über Leptin und dessen Funktion mehr und mehr zu. Dass Leptin auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielt, zeigen zahlreiche Studien [21, 28, 52].

Patienten mit rheumatoider Arthritis weisen erhöhte Leptinspiegel sowohl im Plasma als auch in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu gesunden Patienten auf. Die Leptinkonzentration in der Synovialflüssigkeit fallen jedoch geringer aus als im Plasma [11].

In einer Studie stellten Otero ad al. (2006) erhöhte Plasmaspiegel von den mit Adipositas zusammenhängenden Hormonen Adiponectin, Leptin, Resistin und Visfatin bei Patienten mit rheumatoider Arthritis fest [79].

Der enge Zusammenhang von Fettleibigkeit und dem ansteigenden Risiko für Osteoarthritis lässt vermuten, dass auch bei der Arthritis erhöhte Leptinspiegel vorhanden sein könnten.

Hohes Körpergewicht bzw. Adipositas und Osteoarthritis liegen eng beieinander. Adipositas gilt bereits seit langer Zeit durch die Überlastung der Gelenke als eindeutiger Risikofaktor für Osteoarthritis, besonders in den tragenden Gelenken, wie im Kniegelenk und im Hüftgelenk. Aber neuere Studien weisen darauf hin, dass Fettleibigkeit das Risiko für diese Krankheit in allen Gelenken erhöht [17, 25, 78].

Epidemiologische Studien zeigen eine hohe Prävalenz von Osteoarthritis bei ansteigendem BMI und dem daraus zu schließenden engen Zusammenhang [34, 61, 78].

Da diese Krankheit sowohl in belasteten als auch in unbelasteten Gelenken eine ähnliche Progression zeigt, ist zu vermuten, dass es neben dem erhöhten Verschleiß der Gelenke auch einen metabolischen Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und Osteoarthritis gibt.

Eine ähnliche Hypothese stellten Teichthal ad al. (2005) auf, indem sie in Leptin einen ungeprüften systemischen oder lokalen Faktor vermuteten, durch den der metabolische Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und Osteoarthritis und dadurch teilweise die geschlechterspezifische Ungleichheit in der Krankheit zu erklären wäre [92].

In dieser Arbeit konnte eine hochsignifikante Korrelation zwischen Leptin und dem BMI festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit verschiedenen anderen Studien. Sowohl Dumond ad al. (2003) als auch Pottie ad al. (2004) konnten ebenfalls eine hochsignifikante Korrelation zwischen diesen Parametern feststellen [21, 85]. In der letztgenannten Studie konnte zusätzlich ein höherer Leptinspiegel bei Frauen als bei Männern festgestellt werden. Passend dazu zeigte diese Arbeit eine hochsignifikante Korrelation des weiblichen Geschlechts mit Leptin. Außerdem konnte insgesamt bei Frauen ein höherer BMI als bei Männern errechnet werden. Dieses Phänomen könnte mit der hormonellen Regulation des Leptins zusammenhängen. An dieser Stelle sei noch darauf hingewiesen, dass die Expression von Leptin durch Testosteron gehemmt wird, durch weibliche Geschlechtshormone jedoch erhöht [10, 15, 59].

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass eine große Abhängigkeit zwischen Leptinspiegel, BMI und dem Arthrosegrad besteht. Leptinspiegel und BMI zeigten einerseits eine hochsignifikante Korrelation, andererseits korrelierte der Leptinspiegel mit einem ansteigenden Arthrosegrad, d.h. je höher der Leptinspiegel und der BMI, desto höher der Arthrosegrad. Da Frauen insgesamt sowohl einen höheren Leptinspiegel als auch einen höheren BMI aufwiesen, könnte daraus geschlossen werden, dass Frauen häufiger an Osteoarthritis leiden als Männer.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst festgestellt, dass die Leptinspiegel in der Synovialflüssigkeit von Osteoarthritispatienten in Abhängigkeit des Schweregrades der Arthrose signifikant anstiegen.

Dieses Ergebnis deckt sich mit der Studie von Pottie ad al. (2004), die ebenfalls eine erhöhte Leptinkonzentration in der Synovialflüssigkeit in Abhängigkeit von der Ausprägung des Knorpelschadens feststellten [85]. Zusammen weisen diese Ergebnisse auf eine mögliche Bedeutung von Leptin an der Knorpeldegradation hin.

Während noch vor einigen Jahren angenommen wurde, dass Leptin ausschließlich von Fettzellen produziert und exprimiert wird, zeigen neuere Studien, dass viele weitere Zellen auch in anderen Geweben in der Lage sind, Leptin zu produzieren und zu exprimieren. Hier wären z. B. Zellen in der Plazenta, Zellen in der Mucosa des menschlichen Magens, Schleimzellen, Leberzellen, Epithelzellen, Zellen des Gehirns und Muskelzellen zu nennen [43, 44, 96, 98].

Neuere Entdeckungen von Leptin in Knorpel und Osteophyten von Osteoarthrosepatienten zeigen, dass auch Chondrozyten und Osteoblasten in der Lage sind, Leptin zu produzieren, während im gesunden Knorpel nur wenige Chondrozyten Leptin produzieren [21].

Durch die Entdeckung des funktionellen Leptinrezeptors im menschlichen, erwachsenen Chondrozyten des Gelenkknorpels, bekam Leptin im skelletalen Wachstum eine ganz neue Bedeutung [28].

Bereits 2001 zeigten Glasow ad al., dass auch menschliche Fibroblasten der Haut in der Lage sind, sowohl Leptin als auch den Leptinrezeptor zu exprimieren [36].

Neben Chondrozyten und Osteoblasten sind die Synovialfibroblasten eine weitere Hauptkomponente im Gelenk. Derzeit ist die genaue Bedeutung von Synovialfibroblasten in der Knorpeldegradation noch weitgehend unklar. Zahlreiche Studien beschäftigten sich in den letzten Jahren mit deren Aufklärung. Dass sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Arthrose spielen, konnte bereits gezeigt werden. Während erste Hinweise auf eine Beteiligung an der Knorpeldegradation durch eine mögliche Beteiligung des Synoviums an der Produktion von MMPs bereits in den 80er Jahren gegeben wurden [16, 69], so konnte in den letzten Jahren die zytokinstimulierte Sekretion von MMPs in Synovialfibroblasten gezeigt werden [31]. Dass Leptin Einfluss auf den Metabolismus in Chondrozyten nimmt, konnte schon 2001 durch die Arbeit von Figenschau ad al. gezeigt werden [28]. Dieses legt die Vermutung nahe, dass Leptin ebenfalls Einfluss auf die Regulation des Metabolismus in Synovialfibroblasten nimmt. Daher wurde in dieser Studie die Expression sowohl von Leptin als auch von dem Leptinrezeptor in arthrotischen Synovialfibroblasten untersucht. Beides konnte als positiv bestätigt werden und unterstützt damit die Erkenntnis der bedeutenden Rolle von Synovialfibroblasten in der Arthrose.

In den 80er Jahren kam es durch neue technologische Methoden der Zell- und Molekularbiologie zu zahlreichen neuen Erkenntnissen in der Arthroseforschung. Dementsprechend beschäftigte sich eine große Zahl von Studien mit der Identifizierung und Spezifizierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), wodurch deren Bedeutung in der Arthrose immer mehr zunahm. Diese Proteinase sind an entscheidenden physiologischen und pathologischen Prozessen des menschlichen Organismus, welche die strukturgebenden makromolekularen Komponenten des Binde- und Stützgewebes betreffen, beteiligt [30, 63, 82]. Produzenten dieser proteinolytischen Enzyme sind vornehmlich die Chondrozyten [37, 68]. Es konnte festgestellt werden, dass die Endopeptidasen Kollagenase-1 (MMP-1) [7, 27] und Stromelysin-1 (MMP-3) [99] in der Zerstörung der extrazellulären Matrix, eingeschlossen Proteoglykane und Kollagen Typ II, in der Osteoarthritis eine wesentliche Rolle spielen. MMP-1, aber auch MMP-8 und MMP-13 sind die einzigen Enzyme, die in der Lage sind, die intakte Tripelhelix des Kollagens bei neutralem pH zu spalten. MMP-3 ist fähig fibrilläres Kollagen Typ II zu spalten, aber nur in die nicht-helikale amino-telopeptid Struktur [75, 100].

Die inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α , dessen zentrale Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis bereits seit langem bekannt ist [29, 46, 97], hemmen Chondrozyten bei der Proteoglykansynthese und stimulieren gleichzeitig die Expression von Matrixmetalloproteinasen [6].

Wie bereits erwähnt konnte auch in Synovialfibroblasten eine Stimulation von MMPs, insbesondere von MMP-1 und MMP-3, durch TNF- α , IL-1 α und IL-1 β festgestellt werden [31]. Dieses Ergebnis unterstützt ebenfalls die Bedeutung von Synovialfibroblasten neben Chondrozyten in der Pathogenese der Arthrose, wobei insbesondere die MMP-Regulation von großer Bedeutung zu sein scheint.

In der Vergangenheit beschäftigten sich bereits einige Studien mit der Untersuchung des Einflusses von Leptin auf MMPs in unterschiedlichen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Leptin dosisunabhängig zu einer erhöhten Sekretion von MMP-2 und zu einer gesteigerten Aktivität von MMP-9 in Zytotrophoblasten der Plazenta führt [14].

Des Weiteren zeigten Park ad al. (2001) eine durch Leptin stimulierte, erhöhte, ebenfalls dosisunabhängige Expression von MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in atherosklerotischen Endothelzellen [81].

Eine ebenfalls durch Leptin gesteigerte MMP-2 Expression in Endothelzellen stellten Kume ad al. (2002) fest und vermuteten den möglichen Einfluss von Leptin auf die endochondrale Ossifikation durch die Regulation der Angiogenese [51].

In einer erst kürzlich erschienenen Studie zeigten Madani ad al. (2006) eine, durch MMP-2 stimulierte, Expression in Myozyten des Herzens [58].

In einer weiteren erst kürzlich erschienenen Studie beschrieben sie zusammen mit Lee ad al. (2005) eine erhöhte MMP-2 Expression und Aktivität in glomerulären Mesangiumzellen der Niere, aber gleichzeitig keine Veränderung der Kollagensynthese [53].

Basierend auf der stadienabhängigen Erhöhung der Leptinspiegel zusammen mit den regulatorischen Effekten von Leptin auf die MMP-Expression wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit, gemäß der Fragestellung, auf die Regulation von MMP-1 und MMP-3, sowie deren natürlichen Inhibitoren, den Tissue-Inhibitor-of-Metalloproteinase-1 (TIMP-1) und den Tissue-Inhibitor-of-Metalloproteinase-2 (TIMP-2) in den Synovialfibroblasten gelegt.

TIMPs wurden untersucht, da die Imbalance zwischen MMPs und TIMPs anscheinend für die Knorpeldegradation von entscheidender Bedeutung ist. So beschrieben Dean ad al (1989) ein Ungleichgewicht zwischen den MMPs und den MMP inhibierenden TIMPs im Knorpel von Osteoarthrosepatienten im Gegensatz zu gesunden Knorpel [20].

Zytokine, wie z. B. IL-1 regulieren MMPs hoch und verhindern gleichzeitig die Hochregulation von deren spezifischen Inhibitoren, so dass es zu ungleicher Regulation von MMPs und dessen Inhibitoren kommt [64].

Ebenso untersuchte die arthroskopische Arbeit von Marini ad al. (2003) die Bedeutung und Aktivität von MMPs in der Synovialflüssigkeit von Osteoarthrosepatienten. Es wurde die enge Verbindung zwischen ansteigendem Schweregrad des Knorpelschadens und der erhöhten Aktivität von MMP-2 und MMP-13 dargestellt. Gleichzeitig wurde ein reduzierter inhibitorischer Effekt von TIMP-2 auf MMP-2 festgestellt. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, welche

Bedeutung die Imbalance zwischen spezifischer MMP-Aktivität und der inhibitorischen Effizienz der TIMPs in der Pathogenese der Osteoarthritis hat [60]. Ebenso konnten Fuchs et al. (2004) bei der zytokinstimulierten Zunahme der MMP-Sekretion in arthrotischen Synovialfibroblasten keinen begleitenden Anstieg von TIMP-1 und TIMP-2 registrieren, was eine Imbalance und somit erhöhte MMP-Aktivität zur Folge hat [31].

Insbesondere die Menge der TIMPs sind die begrenzenden Faktoren, die dafür verantwortlich sind, in welchem Umfang die MMPs die proteolytische Knorpeldegradation ausüben können. Ausschlaggebend sind die „freien“, nicht komplexgebundenen Proteinase und nicht die primär sezernierten und aktivierten MMP-Mengen. Eine primär zu geringe TIMP-Sekretion hat dadurch bei „physiologischen“ Mengen aktivierter MMPs eine genauso pathologische Bedeutung, wie die augmentierte MMP-Menge bei hoher TIMP-Produktion [19].

Da in der vorliegenden Arbeit Leptin zu keiner erhöhten Sekretion, weder von MMP-1 und MMP-3, noch von TIMP-1 und TIMP-2 und somit zu keiner Veränderung der Netto-Proteaseaktivität führte, muss angenommen werden, dass Leptin nicht an der MMP-Regulation in Synovialfibroblasten beteiligt ist und somit wahrscheinlich keinen direkten Effekt auf die Knorpeldegradation hat.

Dumond et al. (2003) konnten zeigen, dass Leptin die Expression von IGF-1 und TGF- β in Chondrozyten stimuliert, was wiederum mit einer wachsenden Proteoglykansynthese verbunden ist [21].

Durch den Mangel an Wissen über die Funktion von Leptin im Gelenk, ist es nicht klar, ob die wachsende Produktion von Leptin bei Arthrose nun gut oder schlecht ist. Wenn dieses Peptidhormon ein anabolischer Faktor ist, das heißt einen direkten oder durchgehenden Effekt auf die IGF-1- und TGF- β -Produktion hat, dann könnte die wachsende Produktion von Leptin ein Teil des Reparaturmechanismus sein. Dies wiederum heißt, dass wenn Fettleibigkeit mit reduzierter Leptinsensibilität im Gewebe des Gelenks assoziiert ist, dann könnte Leptin eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Arthrose spielen, vorausgesetzt die Aktivität der Wachstumsfaktoren erhält die Knorpel- bzw. Knochenintegrität aufrecht.

Alternativ dazu, wenn die Antwort auf die Leptinstimulation bei Fettleibigkeit normal ist und die Leptinwerte erhöht, könnte Leptin eine schädigende Wirkung haben, z. B. in Form von Osteophytenbildung, NO-Produktion oder Zytokinaktivität [56]. Durch den durch Leptin induzierten Anstieg von den Wachstumsfaktoren im Gelenk, insbesondere TGF- β , scheint Leptin in der Osteophytenbildung, was ein typisches Merkmal für arthrotische Gelenke ist, direkt involviert zu sein [21], bzw. indirekt durch den Einfluss auf die endochondrale Ossifikation durch die Regulation der Angiogenese [51].

Otero ad al. (2004) beschrieben ebenfalls einen schädlichen Effekt von Leptin auf den Gelenkknorpel, ähnlich wie die proinflammatorischen Zytokine, da es zum einen, synergistisch mit IFN- γ die Stickoxid-synthase Typ II in Chondrozyten steigert, und zum anderen einen synergistischen Effekt mit dem wohl in der Arthrose relevanteste Zytokin IL-1 aufweist. Damit widerlegen sie die von Bokarewa ad al. aufgestellte Vermutung, dass Leptin einen schützenden Effekt auf die Knorpeldestruktion hat [11, 80].

Leptin spielt sicherlich eine bedeutende Rolle in der Osteoarthritis. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Leptin keinen Einfluss auf die Sekretion, weder der untersuchten MMPs noch der TIMPs durch Synovialfibroblasten *in vitro* hat, so zu keiner Veränderung der Netto-Proteaseaktivität führt und damit keinen direkten Einfluss auf die Knorpeldegradation hat.

Die Frage, ob Leptin also nun einen positiven oder negativen Effekt auf die Pathogenese der Osteoarthritis hat, konnte mit dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden und bleibt somit weiter offen. Man darf also auf weitere Studien gespannt sein, die sich mit diesem Thema beschäftigen.

5 Literaturverzeichnis

1. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K et al. (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 29: 1039-1049
2. Altman R, Alarcon G, Appelrouth D, Bloch D, Borenstein D, Brandt K, Brown C, Cooke TD, Daniel W, Feldmann D (1991) The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum* 34 (5): 505-514
3. Ashhurst DE, Bland YS, Levick JR (1991) An immunohistochemical study of the collagens of rabbit synovial interstitium. *J Rheumatol* 18: 1669-1672
4. Benninghoff A (1985) Makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. Hrsg. Staubesand, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, Bd.1, 14. Auflage, S.135-137, 220-221
5. Benninghoff A (1994) Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Hrsg. Drenckhahn D, Zenker W, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, Bd.1, 15. Auflage, S.357
6. Berg Wvd (1999) The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 58: 136-141
7. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, Mitchell P, Hambor J, Diekmann O, Tschetsche H, Chen J, Van Wart H, Poole AR (1997) Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic cartilage *J Clin Invest* 99 (7): 1534-45
8. Birkedal-Hansen H, Cobb CM, Taylor RE, Fullmer HM (1976) Synthesis and release of procollagenase by cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 251 (10): 3162-8
9. Blanco JF, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M (1995) Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146: 75-85
10. Blum WF, Englaro P, Hatsch S, Juul A, Hertel NT, Muller J, Skakkebaek NE, Heiman ML, Birkett M, Attansio AM, Kiess W, Rascher W (1997) Plasma leptin

levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *Clin Endocrinol Metab* 82: 2904-2910

11. Bokarewa M, Bokarew D, Hultgren O, Tarkowski A (2003) Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62: 952-956

12. Buckwalter JA, Hunziker E, Rosenberg LC, Coutts R, Adams M, Eyre D (1987) Articular cartilage: Composition and structure. In: *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Eds: Woo SLY, Buckwalter JA: American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, IL

13. Burgeson R (1992) Collagen types. *Clin Orthop* 282: 250-272

14. Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Cancelli R, Monsurro V, Islami D, Sarzani R, Marziani D, Cinti S, Bischof P (2000) Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod* 6 (10): 951-8

15. Castracane VD, Kraemer RR, Franken MA, Kraemer GR, Gimpel T (1998) Serum leptin concentration in women: effect of age, obesity, and estrogen administration. *Fertil Steril* 70: 472-477

16. Chin JR, Murphy G, Werb Z (1985) Stromelysin, a connective tissue-degrading metalloendopeptidase secreted by stimulated rabbit synovial fibroblast in parallel with collagenase. Biosynthesis, isolation, characterization, and substrates. *J Biol Chem* 260 (22): 12367-76

17. Cicuttini FM, Baker JR, Spector TD (1996) The association of obesity with osteoarthritis of the hand and knee in women: a twin study. *J Rheumatol* 23: 1221-6

18. Cicuttini FM, Spector TD (1995) Osteoarthritis in the aged. Epidemiological issues and optional management. *Drugs aging* 6 (5): 409-420

19. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr. (1989) Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 84: 678-85

20. Dean DD, Woessner JF (1984) Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases. *Biochem J* 218: 277-80

21. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottier P (2003) Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48 (11): 3118-29
22. Edwards JCW, Willoughby DA (1982) Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Ann Rheum Dis* 41:177-182
23. Erggelet C, Steinwachs M (2001) Gelenkknorpeldefekte. Steinkopfverlag, Darmstadt. S. 167-181, 211
24. Faggioni R, Fantuzzi G, Fuller J, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C (1998) IL-1 beta mediates leptin induction during inflammation. *J Am J Physiol* 274: R204-208
25. Felson DT, Chaisson CE (1997) Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 11 (4): 671-81
26. Fergusson CM (1987) The aetiology of osteoarthritis. *Postgrad Med J* 63: 439-445
27. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Moldovan F, Jovanovic D, Raynaud JP, Pelletier JP (1998) Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol* 25 (8): 1585-94
28. Figenschau Y, Knutsen G, Shahzeydi S, Johansen O, Sveinbjörnsson B (2001) Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 190-197
29. Fong KY, et al. (1994) Cytokine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: Correlation with bony erosions. *Clin Exp Rheumatol* 12: 55-58
30. Freemont AJ, Hampson V, Tilman R, Goupille P, Taiwo Y, Hoyland JA (1997) Gene expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 by chondrocytes in osteoarthritic human knee articular cartilage is zone and grade specific. *Ann Rheum Dis* 56: 542-9
31. Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B (2004) Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 12 (5): 409-18

32. Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ (2003) Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF- α in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A Suppl 3: 59-66
33. Garcia F (1999) Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 308-309
34. Gelber AC, Hochberg MC, Read LA, Wang NY, Wigley FM, Klag MJ (1999) Body mass index in young men and the risk of subsequent knee and hip osteoarthritis. *Am J Med*, 107: 542-548
35. Glasow A Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP, Bornstein SR (1998) Expression of OB receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (12): 4459-66
36. Glasow A, Kiess W, Anderegg U, Berthold A, Bottner A, Kratzsch J (2001) Expression of leptin (ob) and leptin receptor in human fibroblasts: Regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4472-4479
37. Goldring MB (2000) The role of chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism* 43 (9): 1916-26
38. Gualillo O, Eiras S, Lago F, Dieguez C, Casanueva FF (2000) Elevated serum leptin concentration induced by experimental acute inflammation. *Life Sci* 67 (20): 2433-2441
39. Gunja-Smith Z, Nagase H, Woessner JF Jr (1989) Purification of the neutral proteoglycan-degrading metalloproteinase from human articular cartilage tissue and its identification as stromelysin matrix metalloproteinase-3. *Biochem J* 258 (1): 115-9
40. Hajnos G (2001) Arthrosebehandlung. Aktueller Stand und Zukunftsaussichten. *Ars Medici* 13: 661-664
41. Häuselmann HJ, Hedbom E (2002) Von der Pathogenese der Arthrose zu therapeutischen Empfehlungen und Knorpelersatz. *Schweiz Med Forum* 25: 610-615
42. Henderson B, Pettipher ER (1985) The synovial lining cell: Biology and pathobiology. *Arthritis Rheum* 15: 1-32
43. Himms-Hagen J (1999) Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci* 36:575-655

44. Jin L, Burguera BG, Couce ME et al. (1999) Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 2903-2911
45. Jorring K (1980) Osteoarthritis of the hip: epidemiology and clinical role. *Acta Orthop Scand* 51: 523-530
46. Joosten LAB, Helsen MMA, Loo Fvd, Berg Wvd (1996) Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A Comparative Study using Anti-TNF α , Anti-IL-1 α/β , and IL-1Ra. *Arthritis Rheum* 39 (5): 797-809
47. Kaneto S, Ohtani H, Ishidoya S, Takeda A, Ogata Y et al. (1999) Increased expression of TGF-beta1 but not its receptor contributes to human obstructive nephropathy. *Kidney Int* 56: 2137-43
48. Kellgren JH, Lawrence JS (1957) Radiological asseement of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* 16: 494-502
49. Knudson CB (1993) Hyaluron receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J Cell Biol* 120 (3): 825-834
50. Krämer J (1998) Orthopädie. Springer Verlag, 5. Auflage, S.403
51. Kume K, Satomura K, Nishisho S, Kitaoka E, Yamanouchi K, Tobiume S, Nagayama M (2002) Potential role of leptin in endochondral ossification. *J Histochem Cytochem* 50 (2): 159-69
52. Lajeunesse D, Pelletier JP, Martel-Pelletier J (2005) Osteoarthritis: a metabolic disease induced by local abnormal leptin activity? *Curr Rheumatol Rep* 7 (2): 79-81
53. Lee MP, Madani S, Sekula D, Sweeney G (2005) Leptin increases expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and does not alter collagen production in rat glomerular mesangial cells. *Endocr Res* 31 (1): 27-37
54. Leonhardt H (1990) Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Thieme Verlag, S.134-137, 153
55. Löffler G, Petrides PE (2003) Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, 7. Auflage, S.791
56. Loeser RF (2003) Systemic and local regulation of articular cartilage metabolism: Where does leptin fit in the puzzle? *Arthritis Rheum* 48 (11): 3009-12

57. Lüllmann-Rauch R (2003) Histologie. Verstehen-Lernen-Nachschlagen. Thieme Verlag, S.117-121
58. Madani S, De Girolamo S, Munoz DM, Li RK, Sweeney G (2006) Direct effects of Leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 69 (3): 716-25
59. Mantzoros CS, Moschos S, Avramopoulos I, Kaklamani V, Liolios A, Doulgerakis DE, Griveas I, Katsilambros N, Flier JS (1997) Leptin concentration in relation to body mass index and the tumor necrosis factor-alpha system in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3408-3413
60. Marini S, Fasciglione GF, Monteleone G, Maiotti M, Tarantino U, Coletta M (2003) A correlation between knee cartilage degradation observed by arthroscopy and synovial proteinases activities. *Clin Biochem* 36 (4): 295-304
61. Marks R, Allgrante JP (2002) Body mass indices in patients with disabling hip osteoarthritis. *Arthritis Res* 4: 112-116
62. Martel-Pelletier J (1999) Proinflammatory mediators and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7: 315-316
63. Martel-Pelletier J, Cloutier JM, Pelletier JP (1986) Neutral proteases in human osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* 29 (9): 1112-1121
64. Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP (1994) Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloproteases may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Lab Invest* 70: 807-15
65. Mehraban F, Lark MW, Ahmed F, Xu F, Moskowitz RW (1998) Increased secretion and activity of matrix metalloproteinase-3 in synovial tissue and chondrocytes from experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 6: 286-94
66. Menkes CJ (1991) Radiographic criteria for classification of osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 27: 13-15
67. Miller EJ (1972) Structural studies on cartilage collagen employing limited cleavage and solubilization with pepsin. *Biochemistry* 11: 4903
68. Morales TJ, Kuettner KE (1982) The properties of the neutral protease released by primary chondrocyte cultures and its action on proteoglycan aggregate. *Biochem Biophys Acta* 705: 92-93

69. Murphy G, Mc Guire MB, Russell RG, Reynolds JJ (1981) Characterization of collagenase, other metallo-proteinases and an inhibitor (TIMP) produced by human synovium and cartilage in culture. Clin Sci 61: 711-716
70. Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF Jr (2001) Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. Methods Mol Biol 151: 421-4
71. Nagase H, Woessner JF Jr (1999) Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 274: 21491-21494
72. Nakase T, Miyaji T, Tomita T, Kaneko M, Kuriyama K, Myoui A, Sugamoto K, Ochi T, Yoshikawa H (2003) Localisation of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. Osteoarthritis Cartilage 11 (4): 278-84
73. Niethard FU, Pfeil J (1992) Orthopädie. Hippokrates Verlag, 2. Auflage, S.167
74. Nishida T, Kubota S, Nakanishi T, Kuboki T, Yosimichi G, Kondo S, Takigawa M (2002) CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, stimulates proliferation and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes. J Cell Physiol 192 (1): 55-63
75. Okada Y, Nagase H, Harris ED Jr. (1986) A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. J Biol Chem 261 (14): 245-55
76. Okada Y, Nagase H, Harris ED Jr. (1987) Matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 from rheumatoid synovial cells are sufficient to destroy joints. J Rheumatol 14: 41-2
77. Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, Bayliss MT, Iwata K, Nagase H (1992) Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium. Lab Invest 66(6): 680-90
78. Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM (1999) Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip and knee. Epidemiology 10: 161-166
79. Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O (2006) Changes in fat-derived hormones plasma concentration: adiponectin, leptin, resistin and visfatin in rheumatoid arthritis subjects. Ann Rheum Dis. 2006 Jan 13

80. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O (2005) Leptin, from fat to inflammation: old question and new insights. *FEBS Lett* 579 (2): 295-301. Review
81. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, Hong BK, Lee JY, Park BE, Jang Y, Cho SY, Kim HS (2001) Potential role of Leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 33 (2): 95-102
82. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Malemud CJ (1988) Canine osteoarthritis: effects of endogenous neutral metalloproteoglycanases on articular cartilage proteoglycans. *J Orthop Res* 6 (3): 379-88
83. Pitsillides AA, Wilkinson LS, Mehdizadeh Synovialis et al. (1993) Uridine disphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: The description of a specialized synovial lining cell. *Int J Exp Pathol* 74: 27-34
84. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S (2001) Composition and Structure of Articular Cartilage. A Template for Tissue Repair. *Clin orthop an* 391S: S26-S33
85. Pottie P, Presle N, Dumond H et al. (2004) Is leptin the link between obesity and osteoarthritis? *Arthritis Res Ther* 6 (Suppl 3):82
86. Rediske JJ, Koehne CF, Zhang B, Lotz M (1994) The inducible production of nitric oxide by articular cell type. *Osteoarthritis Cart* 2: 199-206
87. Rössler H, Rüther W, (1996) Orthopädie. Urban & Schwarzenberg, 17. Auflage, S.9-10, 158-159
88. Sachs L (2002) Angewandte Statistik. 10. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
89. Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Riwet 3rd DJ, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR (1997) Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* 185:171-175
90. Spiegel MR, Stephens LJ (2003) Statistik. mitp-Verlag, Bonn, S.493
91. Stevens CR, Mapp PI, Revell PA (1990) A monoclonal antibody (mab 67) marks type B synoviocytes. *Rheumatol Int* 10: 103-106
92. Teichtahl AJ, Wluka AE, Proietto J, Cicuttini FM (2005) Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects. *Med Hypotheses* 65 (2): 312-5

93. Theiler R (2002) Arthrose. Epidemiologie, Diagnose und Differentialdiagnose, Abklärung und Dokumentation. Schweiz Med Forum 23: 555-561
94. Vincenti MP, Coon CI, Mengshol JA, Yocum S, Mitchell P, Brinckerhoff CE (1998) Cloning of the gene for interstitial collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) from rabbit synovial fibroblast: differential expression with collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) J Biochem 331: 341-6
95. Wachtler F (2000) Histologie. Lehrbuch der Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Facultas Univ. Verl., S.140-142
96. Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L (1998) A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. Nature 393: 684-688
97. Westacott CI, Sharif M (1996) Cytokines in Osteoarthritis: Mediators or Markers of Joint destruction? Semin Arthritis Rheum 25 (4): 254-272
98. Wiesner G, Vaz M, Collier G et al. (1999) Leptin is released from the human brain: influence of adiposity and gender. J Clin Endocrinol Metab 84: 2270-2274
99. Woessner JF Jr, Gunja-Smith Z (1991) Role of metalloproteinases in human osteoarthritis. J Rheumatol Suppl 27: 99-101
100. Wu J-J, Lark MW, Chun LE, Eyre DR (1991) Sites of stromelysin cleavage in collagen type II, IX, X and XI of cartilage. J Biol Chem 266: 5625-8
101. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372:425-432

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: ACR-Klassifikationskriterien der Kniegelenksarthrose.

Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K et al. (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. Arthritis Rheum 29: 1039-1049

Abbildung 1.2: Ätiologie der Arthrosen. Niethard FU, Pfeil J (1992) Orthopädie. Hippokrates Verlag, 2. Auflage, S.167

Abbildung 1.3: Risikofaktoren bei der Entstehung einer Arthrose. Häuselmann HJ, Hedbom E (2002) Von der Pathogenese der Arthrose zu therapeutischen Empfehlungen und Knorpelersatz. Schweiz Med Forum 25: 610-615

Abbildung 1.4 : Verschiedene Aktivitäten verschiedener Zytokinen. Westacott CI, Sharif M (1996) Cytokines in Osteoarthritis: Media

Abbildung 1.5: Tabellarische Zusammenstellung der derzeit bekannten Matrix-Metalloproteinasen [8, 16, 70, 71, 76, 100]

Abbildung 1.6: Tabellarische Übersicht der Substratspezifität und Herkunft von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 [8, 16, 70, 71, 76, 100]

Abbildung 2.1: Röntgenologische Klassifikationen nach Kellgren and Lawrence

Abbildung 2.2: Transkripte der verwendeten Primer

Abbildung 2.3: Spezifität und Sensitivität der ELISA-kits des Biotrak™ ELISA-Systems der Firma Amersham Pharmacia Biotech

Abbildung 3.1: Stadienabhängige Erhöhung der Leptinspiegel in Synovialflüssigkeiten bei insgesamt 10 Patienten

Abbildung 3.2: Leptinspiegel und Arthrosegrad in den Synovialflüssigkeiten

Abbildung 3.3: Korrelationen von Leptin mit den klinischen Parametern

Abbildung 3.4: Zusammenhang BMI und Leptin

Abbildung 3.5: Expression von Leptin, Rezeptor und GAPDH bei insgesamt 5 Patienten

Abbildung 3.6: Aktivität sezernierter MMPs von Leptin-stimulierten Synovialfibroblasten unterschiedlicher Patienten

Abbildung 3.7: Einfluss von Leptin auf die Sekretion von MMP-1 und -3

Abbildung 3.8: Einfluss von Leptin auf die Sekretion von TIMP-1 und -2

7 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
α_2 -Makroglobulin	Bluteiweißkörper der Euglobulinfraktion
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMI	Body Mass Index
BMP	bone morphogenic protein
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
Ca^{2+}	zweiwertiges Calcium
CaCl_2	Calciumchlorid
cDNA	complementary DNA
CD44	Hyaluronsäurerezeptor
CO_2	Kohlendioxid
CTGF	connective tissue growth factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMOAD	Disease-modifying Osteoarthritis Drugs
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamtetraessigsäure
ELISA	EnzymeLinkedImmunoSorbentAssay
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
H_2O	Wasser
IFN	Interferon
IGF	Insulinlike growth factor
IL-	Interleukin-
IQB	Interquartilsabstand
kDa	KiloDalton

kp/mm ²	Kilopond pro Quadratmillimeter
LIF	Leukemia inhibiting factor
Mab67r	monoklonaler Antikörper
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHG	Millimeter pro Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
µl, µm	Mikroliter, Mikrometer
nm, ng	Nanometer, Nanogramm
p	Signifikanzfaktor
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
pg	Picogramm
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonz.
P/S/A	Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin
RNA	Ribonukleinsäure
SADOA	Slow-acting Drugs in Osteoarthritis
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sek	Sekunden
TGF	Transforming growth factor
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TMB-Substrat	3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin als Farbentwickler
TNFr	Tumornekrosefaktor
UPGD	Uridindiphosphoglukosedehydrogenase
WHO	World Health Organisation

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Name: Julia Borchert
Adresse: Karl-Wagenfeld-Straße 12a
59759 Arnsberg
Geburtsdatum: 4. Juli 1979
Geburtsort: Paderborn
Eltern: Dr. Manfred Borchert
†Gabriele Borchert, geb. Junker
Familienstand: ledig

Schulbildung:

Aug. 1986- Juni 1990: Grundschule Thune in Paderborn-Sennelager
Aug. 1990- Juni 1999: Gymnasium St. Michael in Paderborn
Juni 1999: Abitur

Hochschulausbildung:

Okt. 1999- Juli 2005: Studiums der Zahnmedizin an der
Westfälischen-Wilhelms-Universität in
Münster
Sept. 2000: Vorphysikum der Zahnmedizin
Sept. 2002: Physikum der Zahnmedizin
13.7.2005: Staatsexamen der Zahnmedizin
25.7.2005: Approbation als Zahnärztin

Berufliche Ausbildung:

Seit Okt. 2005: Assistenz Zahnärztin in der Gemeinschafts-
praxis Dr. Fischer in Arnsberg

Arnsberg, den 27.9.2006

8.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

in Marburg:

Frau Univ.-Prof. Dr. med. S. Fuchs

Dr. med. C. O. Tibesku

in Münster:

Dr. rer. nat. B. Dankbar

8.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. med. Susanne Fuchs für die Überlassung des Themas.

Herrn Dr. rer. nat. Berno Dankbar möchte ich ganz besonders danken. Er war auch weit über die experimentelle Arbeit hinaus stets für meine Fragen offen, gab viele wertvolle Anregungen, half mir unter wissenschaftlicher Anleitung, den Blick für das Wesentliche nicht zu verlieren und trug so einen entscheidenden Teil für die Entstehung dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. med. Carsten O. Tibesku für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gute Betreuung

Frau Vera Eckervogt, dem guten Geist des Labors, für die große Hilfsbereitschaft.

Christina Peitz, meiner besten Freundin, die trotz eigenem Examensstress Zeit fand, diese Arbeit Korrektur zu lesen.

Fabian Houben für seine Liebe und Geduld und für seine große Hilfe in Sachen EDV.

Meiner Familie, durch die ich immer wieder neue Motivation fand.